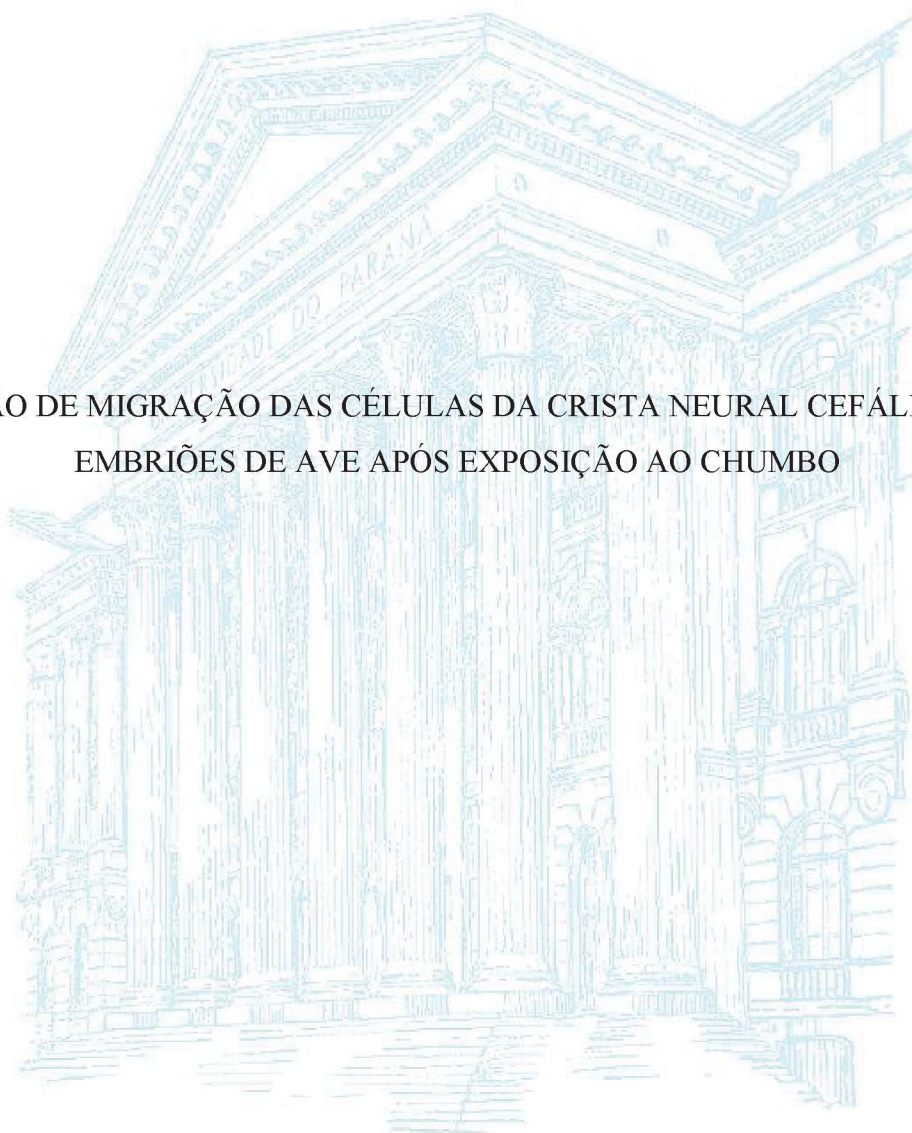


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARILIZA CRISTINE VIEIRA DA COSTA

PADRÃO DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA EM  
EMBRIÕES DE AVE APÓS EXPOSIÇÃO AO CHUMBO



CURITIBA

2018

MARILIZA CRISTINE VIEIRA DA COSTA

PADRÃO DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA EM  
EMBRIÕES DE AVE APÓS EXPOSIÇÃO AO CHUMBO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Feijó Ortolani-Machado

Coorientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

CURITIBA

2018



Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas  
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Costa, Mariliza Cristine Vieira da

Padrão de migração das células da crista neural cefálica em embriões de ave após exposição ao chumbo. / Mariliza Cristine Vieira da Costa. – Curitiba, 2018.

123p. : il. ; 30cm.

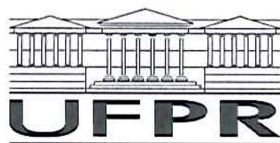
Orientadora: Claudia Feijó Ortolani-Machado

Coorientador: Edvaldo da Silva Trindade

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Crista neural. 2. Chumbo. 3. Metais pesados. I. Título. II. Ortolani-Machado, Claudia Feijó. III. Trindade, Edvaldo da Silva. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.87



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARILIZA CRISTINE VIEIRA DA COSTA** intitulada: **PADRÃO DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA EM EMBRIÕES DE AVE APÓS EXPOSIÇÃO AO CHUMBO**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Março de 2018.

CLAUDIA FEIJÓ ORTOLANI MACHADO  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

KATYA NALIWAIKO  
Avaliador Interno (UFPR)

FLÁVIA SANT'ANNA RIOS  
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico esta Dissertação:

À minha mãe Suzana

pelo imenso amor em cada momento de minha vida e por me ensinar o que é ser valente e altruísta.

Aos meus irmãos Rafa e Gabe,

por estarem sempre comigo, pelas brigas que me tornaram mais forte e pela cumplicidade que apenas irmãos podem proporcionar.

Ao meu melhor amigo e companheiro de jornada, Jean,

por ter paciência e sempre amparar minhas lágrimas durante esta etapa e em tantos outros momentos.

À minha avó Eliza (*in memorian*),

por ser meu maior exemplo do que é ser forte.

Enfim, dedico este trabalho a todos aqueles que sentiram minha ausência durante esses dois anos, mas que mesmo assim tornaram o caminho menos árduo.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup>. Cláudia Feijó Ortolani-Machado, pela paciência, seus sábios conselhos, por todo incentivo, mas especialmente por seu entusiasmo, sua amizade e seu exemplo.

Ao meu coorientador, professor Dr. Edvaldo da Silva Trindade, por toda ajuda desde o início desse trabalho, seu incentivo e paciência.

À professora Dr<sup>a</sup>. Patrícia Franchi Freitas, pela ajuda e por suas palavras sempre motivadoras.

À professora Dr<sup>a</sup>. Célia Regina Cavicchiolo Franco, pelo incentivo e por sua amizade.

Aos professores que ao longo dos dois anos de mestrado avaliaram os relatórios e contribuíram com o enriquecimento deste trabalho.

Ao professor Marco Grassi, do Setor de Química, sua aluna Loana e ao Eder José do TECPAR, por todo auxílio na análise química, e paciência durante as inúmeras adversidades.

Aos meus amigos e companheiros de graduação, César, Jenifer e Tainã, que me apoiaram durante essa jornada.

Aos amigos que mesmo distantes sempre me incentivaram e me deram forças para enfrentar todos os contratempos.

Aos meus colegas do Laboratório de Embriotoxicologia, pelo convívio e todo auxílio proporcionado, em especial à Melyssa que tornou os dias, as noites e madrugadas de estudos e experimentos mais fáceis.

Aos demais professores e colegas do Laboratório de Toxicologia Celular.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pelos ensinamentos e convivência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Enfim, minha gratidão a todos que me acompanharam e que de muitas formas contribuíram para a realização deste trabalho.

*Foi o tempo que dedicastes à tua rosa  
que fez tua rosa tão importante.*

Antoine de Saint-Exupéry



## RESUMO

A crista neural (CN) é uma população celular originada durante a neurulação. Estas células apresentam pluripotencialidade, originando vários tipos celulares, além de alta capacidade migratória e proliferativa. Muitos compostos podem interferir nessas células, ocasionando distúrbios migratórios e malformações no organismo em desenvolvimento. O chumbo é o metal tóxico mais comum no ambiente, sendo considerado um potente teratôgeno. Até o momento não existem estudos sobre o efeito deste contaminante ao longo do tempo nas estruturas cefálicas em desenvolvimento de embriões de ave, sua biodisponibilidade e efeito sobre as células da CN. Assim, no presente trabalho esses parâmetros foram avaliados, buscando identificar o efeito do chumbo sobre o padrão migratório das células da CN cefálica. A exposição foi realizada injetando-se, na câmara de ar do ovo, solução de nitrato de Pb na concentração de  $0,025 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , ou solução fisiológica no controle, previamente à incubação. Os ovos foram incubados a  $38^\circ\text{C}$  por 1 a 4 dias, sendo a viabilidade dos embriões determinada após a abertura. A análise anatômica foi realizada utilizando-se estereomicroscópio e o padrão normal definido conforme descrito por Hamburger e Hamilton (1951). A presença do chumbo foi analisada empregando-se o marcador fluorescente *Leadmium-Green* e sua deposição nas células da região cefálica avaliada através de autometalografia. A quantificação do metal foi realizada por análise química com ICP-MS. O padrão migratório das células da CN foi avaliado com imunomarcador (anti-HNK-1), nos estádios 8-18HH para acompanhar a delaminação e migração dessas células. Os embriões expostos ao chumbo apresentaram um aumento crescente de mortalidade e na ocorrência de malformações. Das alterações encontradas destacam-se malformação na região cefálica e presença de pontos hemorrágicos. A marcação positiva para *Leadmium-Green* foi observada apenas nos embriões expostos, confirmando a presença do chumbo. Nas células ao nível dos rombômeros o metal foi localizado no citoplasma, núcleo ou em ambos. Não foi observado um padrão na deposição, porém foram encontrados acúmulos celulares anormais na luz do tubo neural, sendo que algumas células nestes acúmulos apresentavam marcação sutil para Pb e foram positivas para anti-HNK1, indicando serem células da CN. A quantificação química mostrou que apenas 25% do chumbo inserido na câmara de ar está presente nos embriões. Mesmo em concentrações baixas a exposição ao chumbo é seguida por anomalias de distribuição das células da CN em diversos níveis cefálicos. A localização ectópica dessas células no lúmen do tubo neural, os padrões teciduais e a alteração na rota migratória é condizente com as alterações cumulativas descritas na literatura, como fenótipos corporais aberrantes e anormalidades morfofuncionais. Assim, a correlação entre as alterações relatadas indica que o chumbo altera o padrão migratório das células da CN e o embrião exposto tem alta probabilidade de apresentar malformações e futuramente déficits funcionais nas regiões cranio-faciais.

Palavras-chave: *Gallus gallus*. Metal pesado. Biodisponibilidade. Embriotoxicologia.

## ABSTRACT

The neural crest (CN) is a cell population originated during neurulation. These cells present pluripotentiality, originating sundry cell types, besides high migratory and proliferative capacity. Numerous compounds may interfere with these cells, modifying formation or migration, thus inducing disorders and malformations in the developing organism. Lead (Pb) is the most common toxic metal in the environment, being considered a powerful teratogen. To date there are no studies on the effect of this contaminant on developing cephalic structures of avian embryos over time, their bioavailability and effect on CN cells. Thus, in the present work these parameters were evaluated, seeking to identify the effect of lead on the migratory pattern of cephalic CN cells. The exposure was performed by injecting, into the egg air chamber, Pb nitrate solution at the concentration of  $0,025 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , or physiological solution in the control, prior to incubation. The eggs were incubated at  $38^{\circ}\text{C}$  for 1 to 4 days, with embryo viability being determined after opening. Anatomical analysis was performed under stereomicroscope and the normal pattern defined as described by Hamburger and Hamilton (1951). The presence of lead was analyzed using the *Leadmium-Green* fluorescent marker and its deposition in cephalic region cells evaluated by autometallography. Metal quantification was performed by chemical analysis with ICP-MS. The migratory pattern of CN cells was assessed with immunoreactor (anti-HNK-1) at 8-18HH stages to monitor delamination and migration of these cells. Embryos exposed to lead presented an increasing mortality and malformations occurrence. The alterations found were mainly malformations in the cephalic region and the presence of hemorrhagic points. Positive labeling for *Leadmium-Green* was observed only in exposed embryos, confirming the presence of lead. In cells at the level of the rhombomers the metal was located in the cytoplasm, nucleus or both. No deposition pattern was found, but abnormal cell clusters were observed in the lumen of the neural tube, and some cells in these clusters had subtle labeling for Pb and were anti-HNK1 positive, indicating that they were CN cells. The chemical quantification revealed that only 25% of the lead injected into the air chamber is present in the embryos. Even at low concentrations lead exposure is followed by abnormalities on distribution of CN cells at various cephalic levels. The ectopic location of these cells in the neural tube lumen, tissue patterns, and alteration in the migratory route is consistent with the cumulative changes described in the literature, such as aberrant body phenotypes and morphofunctional abnormalities. Thus, the correlation between the reported changes indicates that lead alters the migratory pattern of CN cells and the exposed embryo has a high probability of presenting malformations and future functional deficits in craniofacial regions.

Keywords: *Gallus gallus*. Heavy metal. Bioavailability. Embryotoxicology.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1 - CLIVAGEM, FORMAÇÃO DO EPIBLASTO E HIPOBLASTO E MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DO EPIBLASTO ATRAVÉS DA LINHA PRIMITIVA EM EMBRIÃO DE AVE..... | 17 |
| FIGURA 2 - DESTACAMENTO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL DURANTE O FECHAMENTO DO TUBO NEURAL.....                                                 | 18 |
| FIGURA 3 - DIVISÃO DIDÁTICA DAS PRINCIPAIS REGIÕES DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÃO DE AVE.....                                                    | 21 |
| FIGURA 4 - MODELO ESQUEMÁTICO DA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA, EM DIFERENTES ESTÁDIOS.....                                  | 22 |
| FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA NOS DIVERSOS ROMBÔMEROS.....                           | 23 |
| FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DO OVO E POSIÇÃO DOS OVOS NA INCUBADORA .....                                             | 32 |
| FIGURA 7 - COLETA DOS EMBRIÕES .....                                                                                                          | 33 |
| FIGURA 8 - ANÁLISE DA VIABILIDADE DOS EMBRIÕES.....                                                                                           | 34 |
| FIGURA 9 - ESTABELECIMENTO DAS REGIÕES DE CORTE .....                                                                                         | 38 |
| FIGURA 10 - DISPOSIÇÃO DO EMBRIÃO NO MOLDE DE GELATINA E NA LÂMINA HISTOLÓGICA .....                                                          | 40 |
| FIGURA 11 - DISPOSIÇÃO DOS CORTES EM LÂMINA HISTOLÓGICA .....                                                                                 | 41 |
| FIGURA 12 - DISPOSIÇÃO DOS CORTES EM PLACA DE 24 POÇOS.....                                                                                   | 42 |
| FIGURA 13 - OCORRÊNCIA E PROGRESSÃO DE MORTALIDADE DOS EMBRIÕES EM DIFERENTES DIAS DE INCUBAÇÃO .....                                         | 45 |
| FIGURA 14 - ANÁLISE ANATÔMICA DOS EMBRIÕES EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO .....                                                       | 47 |
| FIGURA 15 - OCORRÊNCIA E PROGRESSÃO DE MALFORMAÇÕES DOS EMBRIÕES EM DIFERENTES DIAS DE INCUBAÇÃO .....                                        | 48 |
| FIGURA 16 - QUANTIDADE DE Pb INSERIDO E DETECTADO .....                                                                                       | 50 |
| FIGURA 17 - BIODISPONIBILIDADE DE CHUMBO EM EMBRIÕES DE AVE.....                                                                              | 51 |
| FIGURA 18 – DISTRIBUIÇÃO DO CHUMBO EM EMBRIÃO DE AVE.....                                                                                     | 52 |
| FIGURA 19 - BIODISPONIBILIDADE DE CHUMBO NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE <i>Gallus gallus</i> COM 3 DIAS DE INCUBAÇÃO .....                 | 53 |



|                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 20 - BIODISPONIBILIDADE DO CHUMBO EM CORTES DE EMBRIÕES COM 3 DIAS DE INCUBAÇÃO .....                                                                                                      | 54 |
| FIGURA 21 - AUTOMETALOGRAFIA EM EMBRIÃO CONTROLE, CORTE AO NÍVEL DE R5 .....                                                                                                                      | 55 |
| FIGURA 22 - DEPOSIÇÃO DE CHUMBO EM EMBRIÃO EXPOSTO, CORTE AO NÍVEL DE R7 .....                                                                                                                    | 56 |
| FIGURA 23 - DEPOSIÇÃO DE CHUMBO EM EMBRIÃO EXPOSTO, CORTE AO NÍVEL DE R6 .....                                                                                                                    | 57 |
| FIGURA 24 - BIODISPONIBILIDADE DE CHUMBO AO NÍVEL DOS DIFERENTES ROMBÔMEROS .....                                                                                                                 | 58 |
| FIGURA 25 - RELAÇÃO ENTRE A ROTA MIGRATÓRIA DAS CÉLULAS DA CN CEFÁLICA E A BIODISPONIBILIDADE DE CHUMBO AO NÍVEL DOS ROMBÔMEROS 2 E 6 NO ESTÁDIO 14HH .....                                       | 59 |
| FIGURA 26 – CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE <i>Gallus gallus</i> NO ESTÁDIO 8HH .....                                                                                           | 61 |
| FIGURA 27 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 8 HH, POR ROMBÔMERO .....  | 62 |
| FIGURA 28 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE <i>Gallus gallus</i> NO ESTÁDIO 9HH .....                                                                                           | 64 |
| FIGURA 29 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 9 HH, POR ROMBÔMERO .....  | 65 |
| FIGURA 30 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE <i>Gallus gallus</i> NO ESTÁDIO 10HH .....                                                                                          | 67 |
| FIGURA 31 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 10 HH, POR ROMBÔMERO ..... | 68 |
| FIGURA 32 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE <i>Gallus gallus</i> NO ESTÁDIO 11HH .....                                                                                          | 70 |

|                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 33 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE <i>Gallus gallus</i> NO ESTÁDIO 12HH .....                                                                                          | 71 |
| FIGURA 34 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 11 HH, POR ROMBÔMERO ..... | 72 |
| FIGURA 35 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 12 HH, POR ROMBÔMERO ..... | 73 |
| FIGURA 36 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE <i>Gallus gallus</i> NO ESTÁDIO 13HH .....                                                                                          | 75 |
| FIGURA 37 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 13 HH, POR ROMBÔMERO ..... | 76 |
| FIGURA 38 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE <i>Gallus gallus</i> NO ESTÁDIO 14HH .....                                                                                          | 78 |
| FIGURA 39 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 14 HH, POR ROMBÔMERO ..... | 79 |
| FIGURA 40 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE <i>Gallus gallus</i> NO ESTÁDIO 15HH .....                                                                                          | 81 |
| FIGURA 41 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 15 HH, POR ROMBÔMERO ..... | 82 |
| FIGURA 42 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE <i>Gallus gallus</i> NO ESTÁDIO 16HH .....                                                                                          | 84 |
| FIGURA 43 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E                                                                          |    |



|                                                                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 16 HH, POR ROMBÔMERO .....                                                                                                                                | 85 |
| FIGURA 44 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE <i>Gallus gallus</i> NO ESTÁDIO 17HH .....                                                                                                | 87 |
| FIGURA 45 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 17 HH, POR ROMBÔMERO .....       | 88 |
| FIGURA 46 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE <i>Gallus gallus</i> NO ESTÁDIO 18HH .....                                                                                                | 90 |
| FIGURA 47 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 18 HH, POR ROMBÔMERO .....       | 91 |
| FIGURA 48 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIOS 8 AO 18 HH, POR ROMBÔMERO ..... | 93 |
| FIGURA 49 - CÉLULAS HNK-1+ EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO .....                                                                                                                                         | 94 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1 - QUANTIDADE DE OVOS UTILIZADOS.....                                                           | 31 |
| TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DO PADRÃO NORMAL DE DESENVOLVIMENTO,<br>AVALIADAS NA ANÁLISE ANATÔMICA ..... | 35 |
| TABELA 3 - PROGRAMA DE AQUECIMENTO DO FORNO DE MICRO-ONDAS .....                                        | 36 |
| TABELA 4 - PARÂMETROS OPERACIONAIS DO ICP-MS.....                                                       | 37 |
| TABELA 5 - NÚMERO DE EMBRIÕES POR METODOLOGIA.....                                                      | 43 |
| TABELA 6 - EMBRIÕES VIVOS E MORTOS POR DIA DE INCUBAÇÃO .....                                           | 44 |
| TABELA 7 - EMBRIÕES DENTRO DA NORMALIDADE E ALTERADOS .....                                             | 49 |
| TABELA 8 – MÉDIA DO NÚMERO DE CÉLULAS MARCADAS AO NÍVEL DOS<br>ROMBÔMEROS NOS EMBRIÕES EXPOSTOS .....   | 58 |

## SUMÁRIO

|                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                       | <b>15</b> |
| 1.1 EMBRIÃO DE AVE COMO MODELO ANIMAL .....                    | 15        |
| 1.2 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE AVE .....                   | 16        |
| 1.3 CÉLULAS DA CRISTA NEURAL .....                             | 20        |
| 1.4 CHUMBO.....                                                | 25        |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>                                       | <b>29</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL.....                                        | 29        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                | 29        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                               | <b>30</b> |
| 3.1 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES .....                                | 30        |
| 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....                                  | 30        |
| 3.3 MÉTODO DE EXPOSIÇÃO .....                                  | 31        |
| 3.4 COLETA DOS EMBRIÕES .....                                  | 32        |
| 3.5 ANÁLISE DE MORTALIDADE .....                               | 33        |
| 3.6 ANÁLISE ANATÔMICA.....                                     | 34        |
| 3.7 QUANTIFICAÇÃO DE CHUMBO ATRAVÉS DE ANÁLISE QUÍMICA.....    | 35        |
| 3.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA PARA DETERMINAÇÃO DA REGIÃO DOS CORTES | 37        |
| 3.9 BIODISPONIBILIDADE DO CHUMBO .....                         | 39        |
| 3.9.1 <i>Leadmium Green</i> .....                              | 39        |
| 3.9.2 Autometalografia.....                                    | 40        |
| 3.10 IMUNOMARCAÇÃO.....                                        | 41        |
| 3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....                               | 43        |
| <b>4 RESULTADOS .....</b>                                      | <b>44</b> |
| 4.1 MORTALIDADE.....                                           | 44        |
| 4.2 ANÁLISE ANATÔMICA.....                                     | 45        |

|                                                                                                                                             |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3 QUANTIFICAÇÃO DE CHUMBO NOS EMBRIÕES DE AVE.....                                                                                        | 49         |
| 4.4 BIODISPONIBILIDADE DO CHUMBO EM EMBRIÕES DE AVE .....                                                                                   | 50         |
| 4.4.1 <i>Leadmium Green</i> .....                                                                                                           | 50         |
| 4.4.2 Autometalografia.....                                                                                                                 | 54         |
| 4.5 DISTRIBUIÇÃO E MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA .....                                                                     | 59         |
| <b>5. DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                   | <b>94</b>  |
| <b>6 CONCLUSÕES.....</b>                                                                                                                    | <b>105</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                     | <b>106</b> |
| <b>APÊNDICE 1 – CORTE AO NÍVEL DE R6 EM EMBRIÃO EXPOSTO AO CHUMBO, AUTOMETALOGRAFIA E IMUNOMARCAÇÃO COM ANTI-HNK-1 POR PEROXIDASE .....</b> | <b>123</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 EMBRIÃO DE AVE COMO MODELO ANIMAL

O embrião da espécie *Gallus gallus* (*G. gallus*), comumente conhecido como embrião de galinha, é considerado um excelente modelo animal no campo da Embriologia e Biologia do Desenvolvimento, uma vez que apresenta algumas vantagens em relação a outros modelos (DAVEY; TICKLE, 2007; KAIN et al., 2014; BERNARDO; THORSTEINSDÓTTIR; MUMMERY, 2015; JESSL; SCHEIDER; OEHLMANN, 2018). Dentre elas, podemos citar a facilidade de manutenção dentro do laboratório já que não se exige grande espaço físico e apenas condições de incubação adequadas, como temperatura e umidade. Além disso, apresentam um desenvolvimento independente do corpo da mãe e rápido, pois do momento da postura até a eclosão desenvolvem-se em 21 dias (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Outra vantagem é a observação do embrião *in ovo* desde as primeiras horas do desenvolvimento, sem a necessidade de procedimentos cirúrgicos (MOK et al., 2015).

Devido às vantagens listadas acima, como a facilidade de preservação, o rápido desenvolvimento entre outras, o embrião de ave tem sido muito empregado em estudos relacionados ao uso de medicamentos (HSIEH et al., 2013; MUELLER; BURGGREN; CROSSLEY, 2013; WANG, 2017), à angiogênese no processo tumoral (RIVERA-LOPEZ; TUCKER; LYNCH, 2008; HEIDEGGER et al., 2014; CATINO et al., 2017), ao sistema endócrino (LIU; PORTER, 2004; HARRINGTON et al., 2010; TANAKA; IZUMI; KUROIWA, 2017) e à utilização da membrana corioalantóica como modelo experimental (NOWAK-SLIWINSKA; SEGURA; IRUELA-ARISPE, 2014; PINK et al., 2015; RIBATTI, 2016). Outro campo utilizando-se o embrião de ave é a embriotoxicologia, pois seu desenvolvimento externo evita que determinadas análises, como a exposição a contaminantes, possam sofrer alterações devido à interação embrião/progenitor (HAN et al., 2011; SMITH; FLENTKE; GARIC, 2012; MATTSSON et al., 2015; BJØRNSTAD et al., 2015; KOBUS-BIANCHI et al., 2017). Por isso tem se mostrado promissor em análises que evidenciam alterações morfológicas e bioquímicas após exposição a diferentes contaminantes (RIVEIRO et al., 2006; MÜLLER et al., 2008; YAMAMOTO et al., 2012; KMECICK, 2017).

Além disso, a partir da gastrulação, o desenvolvimento embrionário de aves e humanos se assemelham (GILBERT, 2010; IRIE; KURATANI, 2011; HILL, 2017), o



que é um indicio que permite a extrapolação entre os resultados encontrados após a exposição dos embriões de ave aos contaminantes (HEID; WALKER; SWANSON, 2001; SOUCY et al., 2003; BASU et al., 2013; FARHAT et al., 2013; SHARP; FEDOROVICH, 2015) aos riscos da exposição humana.

## 1.2 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE AVE

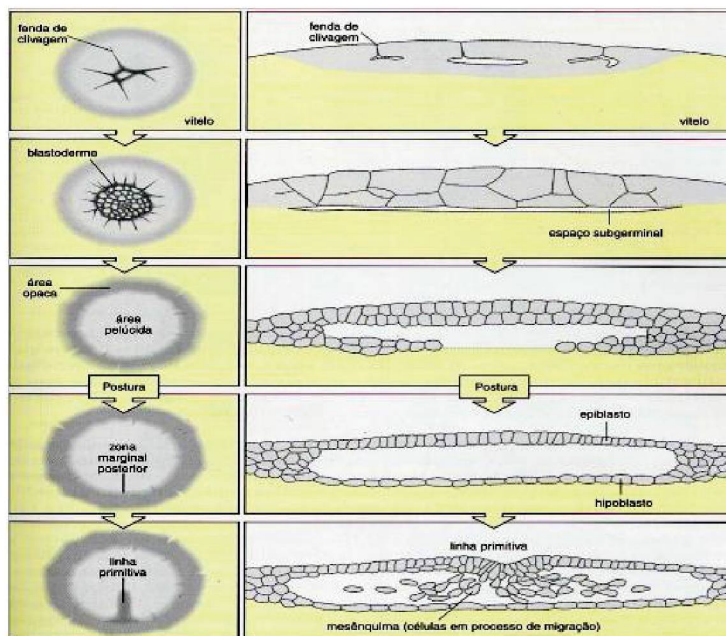
O desenvolvimento embrionário em vertebrados é bastante semelhante nas fases iniciais. Os embriões de ave apresentam similaridade morfológica e molecular com outros vertebrados no período filotípico, que ocorre durante a organogênese (IRIE; KURATANI, 2011; HILL, 2017). A semelhança morfológica está relacionada a genes altamente conservados entre as espécies, como os genes da família *Hox*, que geram um padrão corporal semelhante (SLACK; HOLLAND; GRAHAM, 1993). Assim, todos apresentam características que os tornam muito parecidos e exibem especificidades de embriões de cordados como notocorda, tubo neural dorsal, somitos, coração ventral e arcos branquiais (SLACK, 2012).

Em aves, o desenvolvimento ocorre externo ao corpo da fêmea e seus ovos são do tipo telolécito (apresenta grande quantidade de vitelo) (GILBERT, 2010). A região que dará origem ao novo indivíduo fica restrita a uma pequena porção da célula, denominada citoplasma ativo ou cicatrícula. A fecundação é interna e ocorre na porção mais proximal do oviduto da fêmea (infundíbulo). Sua clivagem é do tipo discoidal, onde apenas a região do citoplasma ativo sofrerá mitoses sucessivas, levando à formação de uma blástula em forma de disco, denominada de blastoderme ou blastodisco (WOLPERT, 2000). A região central do blastodisco é separada do vitelo por uma camada de células que repousa sobre uma cavidade subgerminativa mais clara (área pelúcida), sendo as regiões marginais menos translúcidas por ter contato direto com o vitelo (área opaca) (GILBERT, 2010). O processo de clivagem nas aves ocorre enquanto o ovo ainda se encontra no interior do corpo da fêmea. Assim, na postura, o embrião já se encontra na fase de blastoderme (ou blástula).

Após a postura do ovo, o embrião continuará seu desenvolvimento se houver condições adequadas de temperatura, ventilação e umidade, dando início à gastrulação. Nesse estágio o embrião apresenta duas camadas celulares, o epiblasto na porção dorsal e o hipoblasto na porção ventral (GILBERT, 2010). No início da gastrulação ocorre o espessamento do epiblasto, pelo acúmulo de células devido a proliferação, na região

central e posterior da área pelúcida, dando origem à linha primitiva (WOLPERT, 2000) (Figura 1).

FIGURA 1 - CLIVAGEM, FORMAÇÃO DO EPIBLASTO E HIPOBLASTO E MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DO EPIBLASTO ATRAVÉS DA LINHA PRIMITIVA EM EMBRIÃO DE AVE



FONTE: WOLPERT (2000).

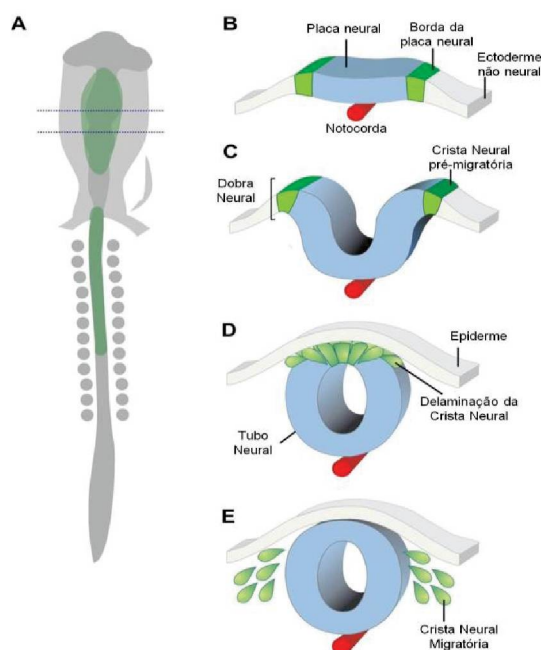
Durante a gastrulação ocorrem profundas mudanças na estrutura geral do embrião, com intensos movimentos de células e camadas celulares, tornando-o uma estrutura complexa tridimensional, ou seja, constituído por três folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme), dos quais todos os órgãos serão derivados (GILBERT, 2010).

Em embriões de vertebrados o desenvolvimento da maioria das estruturas ocorre a partir da região anterior para posterior. A neurulação se inicia na região anterior antes do término da gastrulação, que está ocorrendo nas regiões posteriores. A neurulação é o processo através do qual a ectoderme será dividida em duas partes distintas: a ectoderme epidérmica, que originará a epiderme e seus anexos, e a ectoderme neural, que formará o sistema nervoso central (WOLPERT, 2000) e outros derivados.

Na neurulação ocorre a formação da placa neural (espessamento da ectoderme neural através da mudança morfológica das células que a compõem) na linha média do embrião. Essa se invagina formando o sulco neural ao centro, com as pregas neurais nas laterais. Essa invaginação dará origem ao tubo neural através da fusão das pregas neurais.

Sua porção mais anterior, localizada na região cefálica, dará origem ao encéfalo, enquanto o restante de sua extensão (porção posterior) originará a medula espinhal. As células contidas nas extremidades das dobras neurais irão segregar e formar uma população distinta de células, a crista neural (WOLPERT, 2000) (Figura 2).

FIGURA 2 - DESTACAMENTO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL DURANTE O FECHAMENTO DO TUBO NEURAL



Vista dorsal esquemática de um embrião de ave. (A) As linhas pontilhadas delimitam a região representada em corte transversal (B-E). (B) O desenvolvimento da crista neural começa no estágio de gástrula, com a especificação da borda da placa neural. (C) À medida que a placa neural se fecha para formar o tubo neural, a crista neural é especificada na parte dorsal das pregas neurais. (D) Após, as células da crista neural sofrem transformação de epitélio para mesênquima e delaminam-se a partir da porção dorsal do tubo neural. (E) As células da crista neural migratória seguem caminhos específicos para vários destinos, onde irão dar origem a derivados distintos. FONTE: Adaptado de SIMÕES-COSTA; BRONNER (2015).

Apesar da gastrulação apresentar algumas peculiaridades em cada fase, dependendo do grupo animal em questão, a neurulação é comum a todos os vertebrados (BRONNER-FRASER, 1994).

Particularmente, durante o desenvolvimento do embrião de *G. gallus* existem fases nas quais os embriões encontram-se mais propensos ou vulneráveis a influências externas, como exposição a agentes contaminantes ou alterações bruscas no meio externo. De acordo com Christensen (2001), esses períodos críticos podem ser divididos em cinco: o primeiro compreende o período pré-ovoposital (do momento da fertilização até a postura), o segundo, o período pré-incubacional, o terceiro vai do primeiro ao terceiro dia de incubação, o quarto do quinto ao décimo oitavo dia e, finalmente, o quinto e último



estágio irá do décimo nono ao vigésimo primeiro dia. Em todas as fases os embriões estão sensíveis a condições de temperatura, umidade e trocas gasosas, o que geralmente é controlado seja em condições experimentais ou pela progenitora. Dos 5 períodos críticos listados acima, destacam-se os três primeiros. No período pré-ovoposital ocorrem sucessivas clivagens, multiplicação e diferenciação celular (CHRISTENSEN, 2001). Durante o início dessa fase a diferenciação entre infertilidade e mortalidade embrionária é quase indistinta (GONZALES, 2005). No período pré-incubacional ocorre a parada no desenvolvimento, que será retomada posteriormente com a incubação. Qualquer falha poderá prejudicar essa retomada. No terceiro período crítico o embrião se adapta às condições de incubação, são retomadas a proliferação e diferenciação celulares (CHRISTENSEN, 2001) e se inicia a formação dos órgãos (BELLAIRS; OSMOND, 2014). Assim, a sensibilidade a fatores externos, principalmente a agentes tóxicos, é superior nos três primeiros períodos críticos (DEWITT; MAYER; HENSHEL, 2005).

A formação do sistema nervoso é particularmente importante e ocorre no terceiro período crítico, sendo que durante a neurogênese acontece uma série de mudanças morfológicas e funcionais. As vesículas encefálicas primárias começam a ser formadas no estágio 9HH (29-33 horas) (HAMBURGER; HAMILTON, 1951) na extremidade mais anterior do tubo neural. No estágio 10 HH (33-38 horas) o cérebro encontra-se dividido em prosencéfalo (cérebro anterior), mesencéfalo (cérebro médio) e rombencéfalo (cérebro posterior). Posteriormente as vesículas encefálicas primárias são subdivididas, sendo que no estágio 11HH (40-45 horas) o rombencéfalo forma o metencéfalo (que originará o cerebelo e ponte pertencente ao tronco cerebral) e o mielencéfalo (que formará a medula oblongada). Nos estádios seguintes (12 e 13HH, que correspondem de 45 a 49 e 48 a 52 horas, respectivamente) o prosencéfalo se divide em telencéfalo (que formará os hemisférios cerebrais) e diencéfalo (precursor do tálamo). O mesencéfalo não se divide, porém aumenta bastante de tamanho por volta do estágio 18HH (65-69 horas) e torna-se claramente marcado antes do rombencéfalo por uma região mais estreita, o istmo (BELLAIRS; OSMOND, 2014).

### 1.3 CÉLULAS DA CRISTA NEURAL

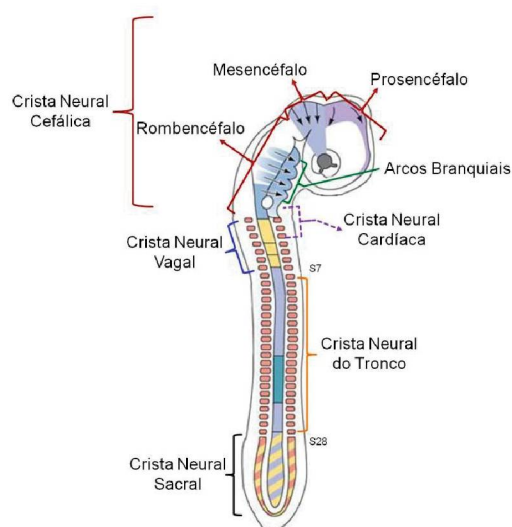
A crista neural (CN) é formada por um tipo celular exclusivo dos vertebrados (BRONNER; SIMÕES-COSTA, 2016). Essas células apresentam grande capacidade de migração, proliferação e pluripotencialidade. Devido a essas características migram para várias regiões e originam diferentes tipos celulares, como neurônios e células gliais do sistema nervoso periférico, células endócrinas e paraendócrinas, melanócitos, componentes conjuntivos e esqueléticos do crânio. Desta forma, as células da crista neural são um excelente modelo para estudo, englobando quase todas as características do desenvolvimento como formação, determinação, diferenciação e migração direcionada (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999).

A formação das células da CN ocorre simultaneamente ao fechamento do tubo neural por algumas células neuroectodérmicas, situadas ao longo da margem interna de cada prega neural. Em embriões de ave isso ocorre aproximadamente a partir do estágio 8 HH (26 a 29 horas) (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Essas células distinguem-se das células do tubo neural, pois sofrem transformação de epitélio para mesênquima devido a alterações em moléculas de adesão, de sua morfologia e perda da lâmina basal, adquirindo, assim, ampla capacidade migratória (MARTINS-GREEN; ERICKSON, 1987; KRULL, 2001). O processo de migração é bastante complexo e envolve a interação de uma série de moléculas, como glicoproteínas de adesão, integrinas e componentes de matriz como fibronectina, laminina e colágeno (ERICKSON; PERRIS, 1993; BONONI et al., 2008; HUANG et al., 2016; SHAH; TANEYHILL, 2015).

As células da crista neural migram para diversos lugares no corpo do embrião em desenvolvimento, através de diferentes vias e formas, dependendo do nível axial analisado (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999). Assim, como observada na figura 3, em aves, a crista neural pode ser dividida didaticamente em: 1- crista neural cefálica (compreende a crista neural localizada ao nível do diencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo), 2- vagal (região entre os somitos 1 e 7), 3- do tronco (do somito 8 até o 27) e 4- sacral (do somito 28 em diante) (LE DOUARIN; KALCHEIM, 1999). Tem-se, ainda, a crista neural cardíaca, que origina precursores que vão participar da septação do trato de efluxo do coração (MIYAGAWA-TOMITA et al., 1991). Essa se encontra colocalizada com as cristas cefálica e vagal, se estendendo da região correspondente à metade da vesícula óptica até o somito 3 (KURATANI; KIRBY, 1991).



FIGURA 3 - DIVISÃO DIDÁTICA DAS PRINCIPAIS REGIÕES DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÃO DE AVE



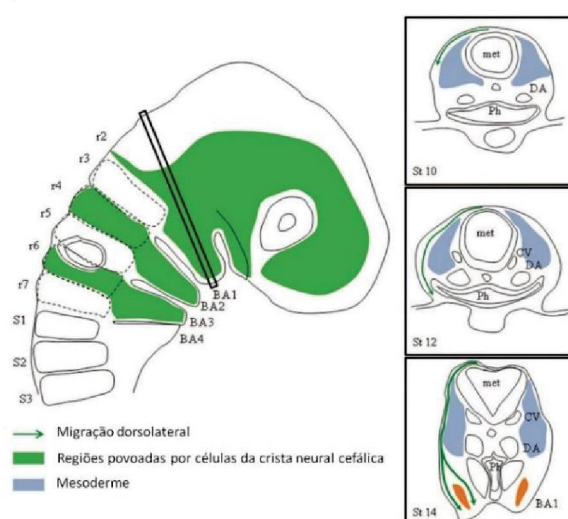
Região cefálica (chaves vermelhas): Prosencéfalo, Mesencéfalo, Rombencéfalo. Região vagal (chave azul), que compreende do 1° ao 7° somito. Região do tronco (chave laranja) vai do 8° ao 27° somito. Região sacral (chave preta), a partir do 28° somito. Crista neural cardíaca (chave roxa pontilhada), colocalizada entre a crista neural cefálica e vagal. Arcos branquiais (chave verde). FONTE: Adaptado de GILBERT (2010).

As células que migram da crista neural cefálica (ou cranial) formarão ossos e cartilagens da face e pescoço; do tronco irão originar os neurônios simpáticos, células pigmentares e medula da glândula adrenal; da crista neural vagal e sacral formarão os gânglios e nervos parassimpáticos do intestino e a crista neural cardíaca terá papel fundamental na divisão entre a aorta e a artéria pulmonar (GILBERT, 2010). De todas, a crista neural cefálica é considerada a região com maior potencialidade pois é a única população de células da crista neural com capacidade de formar ossos e cartilagem faciais (LE LIEVRE; LE DOUARIN, 1975; NAKAMURA; AYER-LE LIEVRE, 1982; KUO; ERICKSON, 2010).

As rotas migratórias das células da crista neural cefálica são bem estabelecidas, migrando predominantemente pela via dorsolateral (Figura 4) a partir do epitélio, pelo mesênquima que circunda o tubo neural, para regiões adjacentes ao tubo. As células da porção cefálica migram do diencéfalo, mesencéfalo e dos rombômeros e apresentam um comportamento migratório particular, dependendo da região axial analisada (LE DOUARIN, 2004). As células da região do tronco, por sua vez, possuem duas vias clássicas, a via ventral (através do somito) e a dorsolateral (entre o somito e a ectoderme) (LE DOUARIN; KALCHEIN, 1999; KUO; ERICKSON, 2010). As células que migram a partir da crista neural cardíaca e vagal estão localizadas em uma zona de transição entre a cabeça e o tronco. Além de sua posição intermediária, essas células compartilham

propriedades migratórias encontradas em ambos os níveis axiais. Entre o 1° e 4° somito, as células da crista neural iniciam sua migração pela via dorsolateral no estágio 10HH, como a crista neural cefálica, enquanto as células ao nível do 5° ao 7° somito começam sua migração na via ventral, como a crista neural do tronco. No estágio 13HH, as células da crista neural dos somitos 1 ao 4 cessam a sua migração na via dorsolateral e começam a migrar na via ventral, enquanto as dos somitos 5 ao 7 continuam a migrar na via ventral. Ao nível sacral (posterior ao somito 28), as células da crista migram através da via ventral (KUO; ERICKSON, 2010).

FIGURA 4 - MODELO ESQUEMÁTICO DA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA, EM DIFERENTES ESTÁDIOS



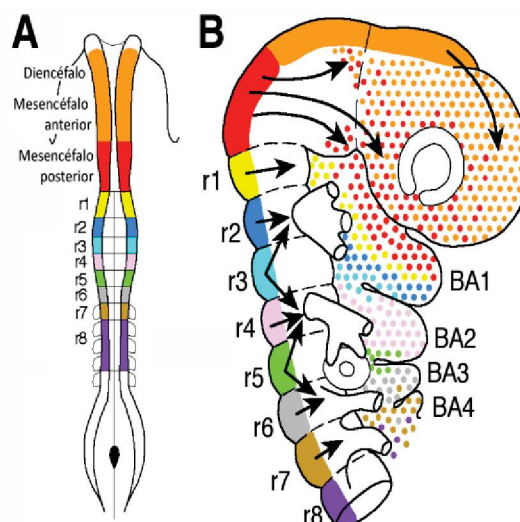
Representação esquemática das células da crista neural cefálica migrando na via dorsolateral (seta verde). A partir do estágio 10HH as células da crista neural migram entre a ectoderme e a mesoderme subjacente (azul). Seções transversais representadas nos estágios (St) 10HH, 12HH e 14HH. As células da crista neural cefálica que atingem o primeiro arco branquial (BA1) migram para ambos os lados dos músculos (laranja) que formarão a mandíbula. Barra em preto indica nível axial das seções. BA 1-4: Arcos branquiais 1 a 4. DA: Aorta dorsal. CV: Veia cardinal. S 1-3: somitos 1 a 3. Ph: Faringe. r1-7: Rombômeros 1 a 7. met: Metencéfalo. FONTE: Adaptado de KUO; ERICKSON (2010).

A migração das células da crista neural tem início aproximadamente no estágio 10 HH. Estas células, ao nível do diencéfalo, migram em direção a porção anterior da cabeça, contornando as vesículas ópticas. A partir do mesencéfalo posterior migram lateralmente pela ectoderme a partir do estágio 12 HH e colonizam o primeiro arco branquial para originar partes da mandíbula. As células da crista neural dos rombômeros (r1-r7) migram para formar três fluxos de células que colonizam os arcos branquiais (LE DOUARIN; KALCHEIN, 1999; BELLAIRS; OSMOND; 2014).

O primeiro fluxo migratório formado pelas células da crista neural que emergem dos rombômeros se inicia ao nível do mesencéfalo, r1 e r2, as quais povoam o primeiro

arco branquial. O segundo fluxo ocorre ao nível de r4 e as células da crista neural contribuem para a colonização do segundo arco branquial. Finalmente, o terceiro fluxo migratório é formado por células da crista neural ao nível de r6 e r7, que preenchem o terceiro e quarto arcos branquiais. Existem poucas células migrando a partir do nível de r3 e r5, sendo que essas juntam-se aos fluxos migratórios anterior e posterior à região da qual emergem. Ou seja, as células que migram a partir de r3 contribuem para preencher o primeiro e segundo arcos branquiais. De maneira similar, as células que migram a partir de r5 contribuem para preencher o segundo e terceiro arcos branquiais. As regiões imediatamente adjacentes a r3 e r5 permanecem sem células da crista (LUMSDEN et. al., 1991; BIRGBAUER et al., 1995; KULESA; FRASER, 1998; KULESA; ELLEIS; TRAINOR, 2004; NODEN; TRAINOR, 2005; KUO; ERICKSON, 2010) (Figura 5). Estudos mostraram que a formação dos fluxos migratórios segregados e a escassez de células da crista neural originárias de r3 e r5 é resultado da apoptose mediada principalmente pela proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4) (LUMSDEN et al., 1994; SMITH; GRAHAM, 2001) e por fatores inibitórios, como semaforinas e o receptor tirosina quinase ErbB4, no local (SECHRIST; SCHERSON; BRONNER-FRASER, 1994; FARLIE et al., 1999; MELLOTT; BURKE, 2008; THEVENEAU; MAYOR, 2014).

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA NOS DIVERSOS ROMBÔMEROS



A: Modelo esquemático da divisão de cada região cefálica, diferenciada por cores. B: Mapa de migração das células que participam da formação da porção frontonasal, periocular e arcos branquiais (BA). As células da crista neural ao nível do mesencéfalo (laranja) anterior e posterior contribuem para formação das regiões frontonasal e periocular. As células da CN do segmento posterior do mesencéfalo também preenchem parte do primeiro BA junto com as células que migram dos rombômeros r1 (amarelo) e r2 (azul escuro). A maior contribuição para o segundo BA vem do r4 (lilás). Células dos r6 (cinza) e r7 (marrom)



migram para o terceiro e quarto BA, respectivamente. As células do r3 (azul claro) migram para o primeiro e segundo BA e as do r5 (verde) migram para o segundo e terceiro BA. As setas indicam o caminho percorrido pelas células da crista neural conforme sua região de origem. Os pontos coloridos indicam as regiões colonizadas pelas células da crista de acordo com seu nível axial de origem. FONTE: Adaptado de LE DOUARIN; KALCHEIM (1999).

Desta forma as células da crista neural cefálica migram extensamente em três correntes estereotipadas para modelar estruturas periféricas da face e pescoço. Essas células ocupam as regiões laterais, ventrais e mediais dos arcos branquiais e, a partir do estágio HH17 (52-64 horas), quando cessa a migração celular, iniciam o processo de diferenciação para formar tecido esquelético e conjuntivo (BELLAIRS; OSMOND, 2014). Outras células da crista neural cessam sua migração ventral próxima ao tubo neural, e a partir de HH12 começam a agregar e posteriormente (HH14, de 50 a 53 horas) são unidas e formam vários gânglios cranianos (MCKEOWNN; WALLACE; ANDERSON, 2003).

Alterações no padrão de formação e migração ou diferenciação da crista neural podem ocasionar uma série de perturbações na formação dos embriões de vertebrados. Em humanos, essas condições são denominadas neurocristopatias e podem acontecer em decorrência de anomalias genéticas, como as síndromes de DiGeorge e Treacher Collins, que estão relacionadas a malformações da face (SNIDER; MISHINA, 2014). Outra alteração bastante descrita é o megacólon congênito (doença de Hirschsprung), cuja ausência de migração das células da crista resulta na falta de gânglios entéricos e, consequentemente, na ausência de movimentos peristálticos nessa região (NAGY; GOLDSTEIN, 2017). Em embriões de ave alterações na migração das células da crista neural foram descritas como promotoras de alterações na formação da medula espinhal, comprimento reduzido do corpo e tamanho diminuído do cérebro (MADEN et al., 1996), microcefalia, formação da fenda óptica aberrante e formação inibida da face (CREUZET, 2009), além de alterações morfológicas no pescoço e sistema cardiovascular (ERICKSON, 1985; TOBIN et al., 2008).

O padrão migratório das células da crista neural pode ser analisado utilizando-se imunomarcadores como o HNK-1 (Natural Killer Humano-1) e o corante vital DiI (BIRGBAUER et al., 1995). O HNK-1 liga-se a porção glicídica da glicoproteína integrina  $\alpha 1\beta 1$  na superfície celular e foi fundamental para o estudo da rota ventral seguida pelas células da crista neural do tronco (RICKMANN; FAWCETT; KEYNES, 1985; BRONNER-FRASER, 1986). Embriões de ave expressam esse marcador até o 3º ou 4º dia de incubação (LE DOUARIN; KALCHEIN, 1999). O DiI (perclorato 1,1-

dioctadecil-3,3',3',3'-tetrametilindocarbocianina) por ser um corante vital permite sua utilização *in vivo* (LUMDESEN et al., 1991; BIRGBAUER, 1995; KULESA; FRASER, 1998) e é excelente para a marcação pontual de células pois apresenta carga negativa e é capaz de se inserir entre os lipídios da membrana mediante um pulso elétrico (ORTOLANI-MACHADO et al., 2012). Ambos são bastante utilizados para a observação da migração das células da crista neural (LUMSDEN; SPRAWSON; GRAHAM, 1991; SERBEDZIJA et al., 1991; KURATANI; KIRBY, 1992; KULESA; FRASER, 2000; FREITAS, 2006; GIOVANNONE et al., 2015; KELDER et al., 2016; MAEDA et al., 2016).

#### 1.4 CHUMBO

O chumbo (Pb) é um metal pesado pertencente à família 4A, com número e peso atômico de 82 e 207,19, respectivamente, e densidade de 11,30 g/cm<sup>3</sup> (ATKINS; JONES, 2001). É pouco encontrado na sua forma livre, estando frequentemente como sulfato de chumbo, sendo ambos pouco absorvidos e praticamente inócuos. Por sua vez, os sais solúveis de chumbo (nitrato, cloreto e acetato) são considerados compostos altamente tóxicos (SARYAN; ZENZ, 1994). O chumbo ocorre naturalmente no ambiente, proveniente de atividade vulcânica, intemperismo geoquímico e névoas aquáticas (PAOLIELLO; CHASIN, 2001). No entanto, importantes fontes emissoras de chumbo são resultantes da atividade humana, como mineração e fundição (WHO, 2016). É considerado um metal não essencial (ATOBALETE; OLUTONA, 2015; DARTEY et al., 2017), ou seja, não apresenta funções fisiológicas descritas (LARINE, 1993).

Mesmo com esforços para diminuir a emissão antrópica, esse ainda é um contaminante bastante preocupante (WHO, 2006; EFSA, 2012). Está envolvido em vários processos industriais (WHO, 2016), como produção de ligas de chumbo, chapas, tubos, revestimentos de cabos, esmaltação de cerâmicas e na produção de pigmentos, PVC e outros plásticos, borrachas e vidros (PAOLIELLO; CHASIN, 2001). Por isso apresenta uma diversidade de aplicações, como protetor radiológico (HAYRE et al., 2018), além de ser usado na confecção de baterias automotivas e balanceamento dos pneus (BOCCHI; FERRACIN; BIAGGIO, 2000). Atualmente sua utilização na indústria de eletrônicos, onde é empregado em soldas e tubos de raios catódicos, é bastante preocupante, pois o descarte destes materiais muitas vezes é realizado de maneira inadequada. Estima-se que

40% da massa dos equipamentos eletroeletrônicos sejam constituídas por chumbo (OLIVEIRA; GOMES; AFONSO, 2010; GRANT et al., 2013; PASCALE, 2016).

O chumbo é um metal tóxico, classificado em 2º lugar no ranque de prioridade da lista de substâncias perigosas da Agência Americana para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR, 2015), cujo uso generalizado tem causado extensa contaminação ambiental e problemas de saúde em muitas partes do mundo. É um tóxico cumulativo e que afeta múltiplos sistemas corporais (WHO, 2016), sendo um dos contaminantes mais comuns no ambiente.

A absorção do metal depende da via de exposição, tamanho da partícula e hidrofobicidade do composto, além dos níveis de absorção variarem de acordo com o tecido exposto (OLLSON et al., 2017). As exposições ocorrem através de inalação (material particulado no ar), ingestão (água e alimentos contaminados) e via cutânea (compostos de chumbo lipossolúveis) (WHO, 2016). Calcula-se que 39-47% do chumbo inalado seja retido nos pulmões, enquanto que no trato gastrointestinal a absorção varia de 2-16% se ingerido pós-prandial (LARINE, 1993). Gestantes e crianças apresentam maior taxa, podendo absorver 45-50% do chumbo presente na dieta (LARINE, 1993), os mecanismos ainda não foram bem definidos, porém a absorção ocorre originalmente no duodeno, e sabe-se que pode envolver transporte ativo e/ou difusão trans ou paracelular, do chumbo ionizado, dos complexos inorgânicos ou orgânicos deste metal (ATSDR, 1999; FLORA; AGRAWAL, 2017).

Após ser absorvido, o Pb é distribuído aos diversos órgãos pelo sangue, onde está ligado aos eritrócitos (98%) (LARINE, 1993). A transferência para os diferentes órgãos e tecidos ocorre primeiro do sangue para os tecidos moles, e posteriormente para tecidos ósseos (ATSDR, 1992; RENNER, 2010). A deposição depende do gradiente de concentração e afinidade pelo tecido específico. Altos níveis do contaminante têm sido encontrados na aorta, fígado, rins e pulmões. A retenção nos tecidos moles se estabiliza na vida adulta e pode decrescer em alguns órgãos, mas continua a se acumular nos ossos e na aorta durante toda a vida (MOREIRA; MOREIRA, 2004a).

A excreção do chumbo pode ocorrer através do trato gastrointestinal e urinário. A urina é responsável por eliminar cerca de 65-70% desse composto (CAPITANI, 2009). Independentemente da forma de excreção, a quantidade excretada é afetada pela idade, sendo que crianças apresentam maior taxa de retenção (aproximadamente 30%) do que adultos (1 a 4%) (MOREIRA; MOREIRA, 2004a). Além da idade, varia de acordo com o compartimento em que o composto se encontra. Sendo assim, em adultos, a meia vida



do contaminante no sangue é de 25 a 30 dias, nos tecidos moles cerca de 60 dias e nos ossos, de 90 dias na porção trabecular e até 30 anos na porção cortical (CAPITANI, 2009; CAROCCI et al., 2016).

O chumbo pode promover intoxicação aguda quando seus níveis no sangue são muito elevados, excedendo  $0,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , levando a encefalopatia e morte (TONG; VON SCHIRNDING; PRAPAMONTOL, 2000; CDC, 2007). A intoxicação crônica, apesar de não levar diretamente à morte, é responsável por causar efeitos adversos em diferentes tecidos (VALENT et al., 2004; CDC, 2007). Sua toxicidade está relacionada a efeitos renais, cardiovasculares, carcinogênicos e teratogênicos (promovendo malformações e disfunções biológicas e metabólicas), influencia na reprodução (disfunções sexuais, abortos e infertilidade), no sistema endócrino e no crescimento. Seus efeitos estão relacionados, principalmente, ao sistema hematopoiético e sistema nervoso central, sendo este o mais sensível ao contaminante (EPA, 2001; MOREIRA; MOREIRA, 2004b). Vários danos ao sistema nervoso periférico são observados em adultos (MOREIRA; MOREIRA, 2004b).

O nível de referência de Pb no sangue, para crianças com idade inferior a 5 anos, foi revisado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) em janeiro de 2012 e passou de  $0,1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  para  $0,05 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ . Esse valor foi baseado na evidência de que a exposição ao Pb em baixas doses altera o desenvolvimento neurológico em crianças (CDC, 2012). No início do desenvolvimento, as crianças, são mais susceptíveis aos efeitos nocivos do chumbo (WHO, 2006), já que este metal atravessa a barreira placentária e possui efeito cumulativo no feto (MAS; AROLA, 1985). Além disso, a maior absorção intestinal, o aumento do metabolismo ósseo e o rápido desenvolvimento do sistema nervoso na criança pode explicar essa sensibilidade ao contaminante. Ele promove atraso no crescimento (HONG et al., 2014), alterações no sistema imune pós-natal (CRINNION, 2009) e déficits intelectuais e cognitivos (MOREIRA; MOREIRA, 2004b; JEDRYCHOWSKI et al., 2008; TAYLOR et al., 2017). Os efeitos do chumbo no sistema nervoso de recém-nascidos podem acontecer uma vez que ele pode alterar a expressão de moléculas de adesão celular envolvidas na formação e manutenção da estrutura neural e função sináptica (DEY et al., 2000).

A toxicidade celular induzida pelo Pb ocorre através de múltiplos caminhos. A toxicidade multissistêmica é mediada por diversos mecanismos, incluindo inativação e alteração de enzimas e outras macromoléculas, ligando-as a radicais sulfidríla, fosfato ou carboxila, e interação, mimetização ou substituição dos íons essenciais (GODWIN,

2001), principalmente cálcio, zinco, magnésio e ferro. Sua entrada na célula ocorre por diferentes canais ou bombas percorridas por esses íons (BRESSLER et al., 2007; FLORA; AGRAWAL, 2017), onde atua como os componentes citados em inúmeros eventos celulares (GARZA; VEJA; SOTO, 2006; FLORA et al., 2007; FLOREA et al., 2013). O estímulo da proteína C quinase (PKC) resulta na alteração da barreira hematoencefálica (OLSON, 2014), permitindo que o chumbo atravessasse essa barreira e se acumule nos astrócitos e, posteriormente, nos neurônios (SANDERS et al., 2009), promovendo a desmielinização e degradação axonal, afetando, assim, os sistemas dopaminérgico, colinérgico e glutaminérgico (OLSON, 2014).

O chumbo pode ocasionar alterações nas membranas celulares e mitocondriais, na síntese e função de neurotransmissores, na síntese do grupamento heme, no estado redox da célula e no metabolismo de nucleotídeos (CAROCCI et al., 2016). Dessa forma, ao alterar os mecanismos citados, o chumbo pode promover inúmeras patologias nos organismos.

Em embriões de *G. gallus* foram relatados alguns efeitos deste contaminante, podemos citar as alterações anatômicas, das quais destacam-se alterações na região cefálica como hidrocefalia e malformações faciais, também são descritos o fechamento incompleto do tubo neural e a presença de extrusão visceral, e em alguns trabalhos diversos tipos de malformações generalizadas (DURSKA, 2001; SCHATZ, 2003; ZHONG et al., 2010; BORGES, 2017). Além disso, hemorragias intra e extraembrionárias são frequentes e também é possível encontrar casos de necrose cefálica (NARBAITZ; MARINO; SARKAR, 1985; SCHATZ, 2003). Trabalhos utilizando chumbo associado ao zinco evidenciaram nos embriões microftalmia, hidrocefalia e deformidades no bico, membros e tronco (ANWER; MEHROTRA, 1988). Além das alterações morfológicas, em embriões de ave, a exposição ao chumbo é associada a outras alterações como aumento na mortalidade (BORGES, 2017), problemas na resposta imune (VALLVERDÚ-COLL et al., 2015), aumento de células apoptóticas no córtex medular e redução na expressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no sistema nervoso dos embriões (SCHATZ, 2003; MÜLLER et al., 2012) e também alterações comportamentais como menor atividade locomotora e exploratória (RIVERO, 2006) e comprometimento em processos cognitivos e de memória (ZHONG et al., 2010).

Tem-se tentado compreender os mecanismos pelos quais o chumbo interfere no desenvolvimento e que resultam nessas alterações. Sugere-se que a biodisponibilidade e

o acúmulo do chumbo tenham importante papel para elucidação dessa questão (MOREIRA; MOREIRA, 2004a; CAPITANI, 2009).

Considerando a potencialidade das células da CN cefálica e sua contribuição para formar diferentes estruturas, especialmente cranianas e faciais, sua migração bem estabelecida e rotas migratórias estereotipadas em particular ao nível dos rombômeros, o estudo do efeito da interferência de xenobióticos nessas células é de altamente relevante. E tendo em vista que o chumbo é um potente contaminante, com efeitos teratogênicos e potencial neurotóxico, sendo previamente relatada sua deposição no cerebelo e medula de embriões de *G. gallus* (SCHATZ, 2003; RIVERO, 2006), regiões originadas a partir do rombencéfalo (BELLAIRS; OSMOND, 2014), torna-se importante o estudo de sua interação com as células da crista neural, e sugere-se que o Pb altera o padrão migratório destas células.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Analisar o efeito do nitrato de chumbo no desenvolvimento de embriões de *Gallus gallus*, enfatizando sua ação no padrão migratório das células da crista neural cefálica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Quantificar quimicamente o Pb no embrião com 3 dias de incubação, através da análise por ICP-MS.
- ✓ Analisar o efeito do nitrato de chumbo em embriões de *G. gallus*, entre o 1º e 4º dia de incubação, em relação à mortalidade e alterações anatômicas.
- ✓ Verificar a biodisponibilidade do nitrato de chumbo em embriões de *G. gallus*, entre 3 e 4 dias de incubação, através de microscopia de fluorescência confocal e autometalografia.



- ✓ Avaliar os efeitos do nitrato de chumbo na migração das células da crista neural cefálica, entre os estádios 8 a 18HH, utilizando imunomarcador específico para as células da crista neural.
- ✓ Estabelecer relações entre as regiões de migração das células da crista neural e as alterações morfológicas já descritas na literatura.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), sob o parecer número 996, aprovado em 09/08/2016.

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS EMBRIÕES

Foram utilizados ovos fertilizados de *Gallus gallus*, doados por empresa especializada, localizada na região metropolitana de Curitiba. Ao chegar no laboratório os ovos foram higienizados previamente com papel toalha umedecido em etanol 70% e pesados. Foram utilizados apenas ovos que apresentaram casca íntegra e peso na faixa de 55 e 63 gramas. Os ovos foram devidamente identificados com lápis na casca de acordo com os grupos experimentais.

#### 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental foi dividido em 2 grupos: 1) CONTROLE, ovos injetados com 100 µl de solução fisiológica (NaCl 0,9%) (veículo) e 2) EXPOSTO, ovos injetados com 100 µl de solução de nitrato de chumbo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) (Sigma Aldrich) na concentração de  $0,025 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  ( $0.015 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  Pb). Essa concentração foi determinada a partir de estudo realizado no Laboratório de Embriotoxicologia do Departamento de Biologia Celular da UFPR, que demonstrou que a exposição ao chumbo nesta concentração apresenta uma alta incidência de malformações no tubo neural e encéfalo (dados ainda não publicados). Foram utilizados apenas 2 controles fechados, para avaliar a biodisponibilidade do chumbo através de marcador fluorescente específico, visto que essa metodologia foi desenvolvida neste trabalho e não existem informações sobre a

autofluorescência do tecido embrionário de *G. gallus*. Para os outros experimentos não foram incubados ovos não injetados (controle fechado), visto que não foi demonstrada diferença significativa entre os controles injetados com solução fisiológica e os não injetados (KMECICK, 2017).

O tempo de incubação foi diferente entre as análises. Para as avaliações anatômicas e de mortalidade foram considerados todos os embriões por dia de incubação (incubados de 1 a 4 dias). Sendo que aqueles incubados entre 3 e 4 dias foram utilizados na análise de biodisponibilidade do chumbo, enquanto os descritos como entre 1 e 2 dias foram incubados até atingir os estádios entre 8 e 18HH e separados para imunofluorescência.

No total foram utilizados 570 ovos, divididos em 8 experimentos independentes, sendo que 90 ovos foram utilizados para análise química por grupo (controle e exposto) e 60 por dia de incubação por grupo (Tabela 1).

TABELA 1 - QUANTIDADE DE OVOS UTILIZADOS

| Grupo             | Ovos incubados |            |            |            | Química   | Total de ovos |
|-------------------|----------------|------------|------------|------------|-----------|---------------|
|                   | 1 dia          | 2 dias     | 3 dias     | 4 dias     |           |               |
| Controle          | 60             | 60         | 60         | 60         | 45        | 285           |
| Exposto ao Chumbo | 60             | 60         | 60         | 60         | 45        | 285           |
| <b>Total</b>      | <b>120</b>     | <b>120</b> | <b>120</b> | <b>120</b> | <b>90</b> | <b>570</b>    |

FONTE: A autora (2017).

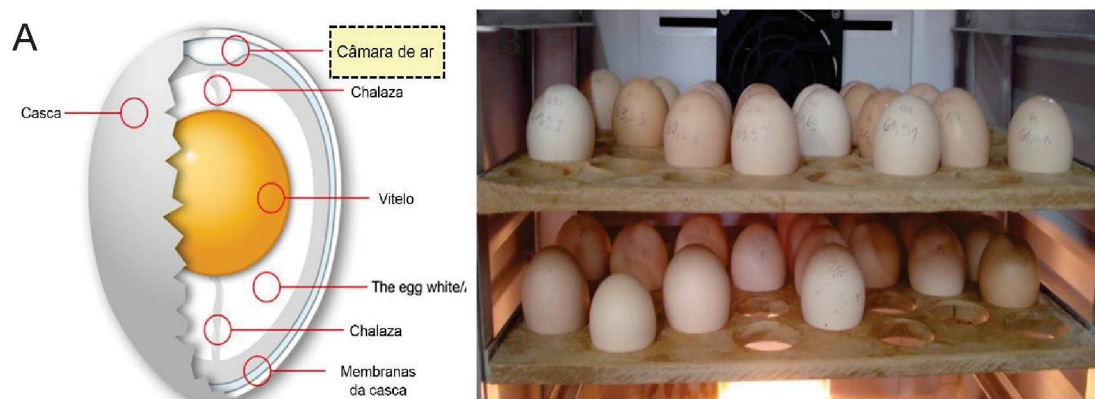
### 3.3 MÉTODO DE EXPOSIÇÃO

Antes da incubação, os ovos devidamente identificados foram injetados com nitrato de chumbo na concentração de  $0,025 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  ( $0,015 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de Pb) ou com solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril, na câmara de ar do ovo (Figura 6A), que é o local que permite melhor dispersão do contaminante no embrião (YAMAMOTO et al., 2012). Inicialmente, no fluxo laminar, foi realizada uma abertura na casca com agulha de grande calibre e posteriormente foram administrados, com agulha de insulina,  $100 \mu\text{l}$  das respectivas soluções. Após a injeção, os ovos foram selados com fita adesiva, posicionados com a câmara de ar voltada para cima e incubados randomicamente em



incubadora BOD (SL-224, SOLAB Científica) (Figura 6B), em temperatura controlada a  $38^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ), com umidade e ventilação constantes.

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DO OVO E POSIÇÃO DOS OVOS NA INCUBADORA



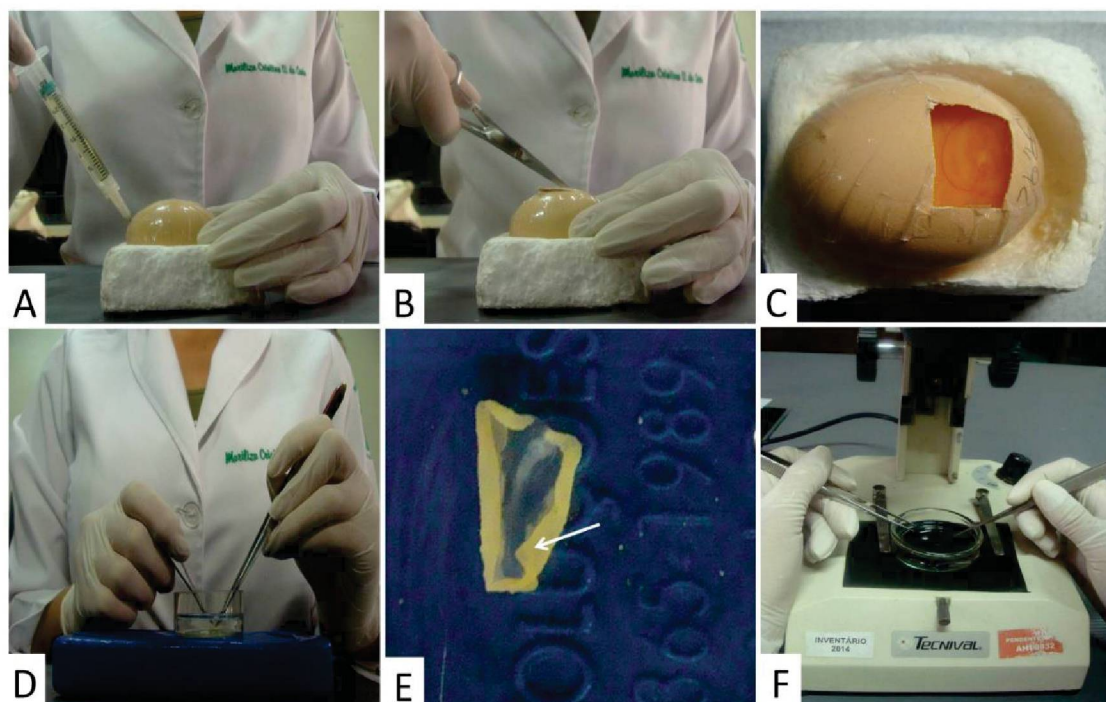
A: Desenho esquemático do ovo de *Gallus gallus*, com indicação de suas partes. FONTE: Adaptado de DAVAFOODS (2017). B: Posição dos ovos na incubadora BOD (SL-224, SOLAB Científica). FONTE: A autora (2017).

### 3.4 COLETA DOS EMBRIÕES

Vinte minutos antes da abertura, os ovos foram colocados na posição horizontal, na incubadora, para que o embrião se posicionasse na parte do ovo voltada para cima, possibilitando sua visualização pela janela da casca. Como a capacidade de nocicepção ocorre somente a partir do 7º dia de incubação (ROSENBRUCH, 1997), não foi necessário anestesiá-los.

Após a remoção dos ovos da incubadora foram retirados 3 ml de albúmen (Figura 7A), para reduzir o volume do conteúdo interno do ovo promovendo o descolamento da membrana interna e, conseqüentemente, a descida do embrião. Com o auxílio de tesoura cirúrgica foi realizada uma abertura na casca de aproximadamente 2x2cm para observação e acesso aos embriões (Figura 7B-C). Em seguida, foram cuidadosamente retirados e colocados em placa de Petri com salina tamponada com fosfato (PBS) sobre placa de gelo (Figura 7D-E). Sob estereomicroscópio, suas membranas extraembrionárias foram retiradas e o estágio do embrião determinado (Figura 7E-F) de acordo com os critérios estabelecidos por Hamburger e Hamilton (1951).

FIGURA 7 - COLETA DOS EMBRIÕES



A: Retirada do albúmen. B: Abertura da casca. C: Visualização do embrião *in ovo*. D: Posicionamento do embrião em placa de Petri. E: Embrião com membranas extraembrionárias (Seta). F: Retirada das membranas extraembrionárias e observação do embrião sob estereomicroscópio. FONTE: A autora (2017).

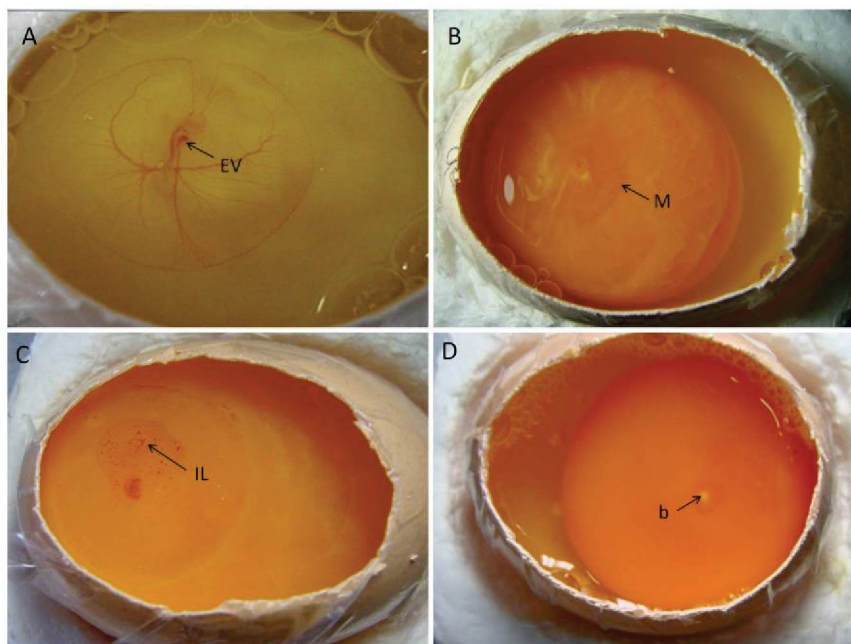
Após o estadiamento, os embriões foram separados para serem processados conforme a metodologia para cada análise.

### 3.5 ANÁLISE DE MORTALIDADE

Foram selecionados 480 ovos, sendo distribuídos em dois grupos, controle e exposto, esses foram incubados de 1 a 4 dias. A viabilidade dos embriões foi determinada após a abertura do ovo. Os mortos foram contabilizados para a taxa de mortalidade e descartados e os vivos coletados para as análises posteriores. Os embriões foram considerados vivos se apresentassem coloração rósea e brilhante, batimentos cardíacos (que iniciam a partir do estágio 10 HH), bem como os vasos sanguíneos extraembrionários íntegros (bem estabelecidos a partir do estágio 16 HH) (Figura 8A). Foram considerados mortos os embriões que apresentavam: membrana vitelínica numa coloração esbranquiçada e opaca (Figura 8B), ausência de batimentos cardíacos e vasos sanguíneos extraembrionários não íntegros (Figura 8C); ou disco embrionário mais desenvolvido que no momento da postura, com características de que o desenvolvimento foi retomado na incubação, porém foi interrompido antes da coleta. Além disso, alguns

embriões foram classificados como não tendo o desenvolvimento retomado na incubação (Figura 8D), e, assim, não foram considerados para a análise de mortalidade, pois foi impossível determinar se a não retomada foi consequência da exposição ao contaminante ou das condições de transporte e armazenamento dos ovos (BOLELI, 2003; MESQUITA, 2011).

FIGURA 8 - ANÁLISE DA VIABILIDADE DOS EMBRIÕES



Ovo com 72 horas de incubação. A: embrião viável (EV); B e C: Embriões mortos. Em B membrana vitelínica na coloração creme (M), e em C destacam-se as ilhotas de sangue (IL) após morte do embrião. D: Não houve retomada do desenvolvimento durante a incubação. Blastoderme: b. FONTE: A autora (2017).

### 3.6 ANÁLISE ANATÔMICA

Todos os embriões vivos foram submetidos à análise anatômica, sendo avaliados 150 no grupo controle e 112 no exposto. A presença ou ausência de malformações foi observada após a retirada das membranas extraembrionárias e estadiamento dos embriões sob estereomicroscópio. Foram consideradas características anatômicas de acordo com o estágio de desenvolvimento (Tabela 2).



TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DO PADRÃO NORMAL DE DESENVOLVIMENTO, AVALIADAS NA ANÁLISE ANATÔMICA

| Estádio Embrionário | Características                          |
|---------------------|------------------------------------------|
| 8 - 13HH            | Orientação das pregas neurais            |
|                     | Flexão craniana                          |
|                     | Orientação do corpo                      |
| 14 - 17HH           | Orientação das vesículas encefálicas     |
|                     | Flexura cranial                          |
|                     | Flexura cervical                         |
|                     | Orientação do corpo                      |
| 18 - 25HH           | Presença e tamanho das vesículas ópticas |
|                     | Local de implantação dos membros         |
|                     | Orientação do broto da cauda             |
|                     | Flexura cranial                          |
|                     | Flexura cervical                         |
|                     | Orientação do corpo                      |

FONTE: Adaptado de HAMBURGER; HAMILTON (1951).

### 3.7 QUANTIFICAÇÃO DE CHUMBO ATRAVÉS DE ANÁLISE QUÍMICA

Para a análise química foram utilizados pools controle e exposto contendo 30 embriões em cada pool entre o 3º e 4º dias de desenvolvimento. Os embriões foram retirados dos ovos como descrito no item 3.4 e colocados imediatamente em Eppendorfs® de 5ml, no gelo, até completar o número necessário de embriões em cada pool. Depois foram armazenados a -20°C até o momento da análise.

A quantificação do chumbo foi realizada no Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), através da técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), no espectrômetro de massa modelo 820-MS Varian (Mulgrave – Australia). O ICP-MS foi calibrado usando padrões de calibração (Tecnologia Agilent) para estabelecer curvas padrão antes da análise. Foi utilizada solução contendo 1000 µg ml<sup>-1</sup> de Índio (In<sup>115</sup>) como padrão interno (complemento da calibração externa). A partir da solução padrão, que contém 1000 µg ml<sup>-1</sup> de chumbo (UltraScientific, Kingston, USA), foram preparadas soluções de 1 a 10 µg.l<sup>-1</sup>, com ácido nítrico a 2% para estabelecer a curva padrão de análise.

Os vasos de Teflon® empregados na digestão foram descontaminados com 10 ml de ácido nítrico (Carlo ERBA Reagentes), utilizando o programa de limpeza por radiação



e temperatura no forno de micro-ondas (Milestone – Start D Microwave Digestion System). Todo material utilizado (tubos do tipo falcon novos, ponteiras e beckers) foi submetido à descontaminação em banho de ácido nítrico 10 % (v/v). Antes da análise, todas as soluções foram submetidas ao ICP-MS para confirmar a ausência de qualquer resíduo de chumbo que pudesse interferir no resultado final do experimento.

As amostras (controle e exposto) úmidas e descongeladas foram pesadas diretamente no vaso de digestão do sistema de micro-ondas, depois foram adicionados 5 ml de ácido nítrico 65% (Merck) e 4 ml de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) (Merck), sendo as amostras mantidas em repouso por 3 horas para reação inicial. Posteriormente, os vasos foram colocados no forno de micro-ondas e a digestão realizada de acordo com o programa mostrado na Tabela 3, conforme descrito por Nardi e colaboradores (2009). Após a digestão as amostras foram transferidas para o tubo do tipo falcon, o volume completado para 25 ml com água ultrapura (sistema MilliQ, Millipore) e as amostras resfriadas e armazenadas por 48 horas até a análise. Os brancos (contendo 5 ml de ácido nítrico 65%, 4 ml de peróxido de hidrogênio 30% e água ultrapura) foram preparados seguindo os mesmos procedimentos aplicados para as amostras.

TABELA 3 - PROGRAMA DE AQUECIMENTO DO FORNO DE MICRO-ONDAS

| <b>Etapas</b> | <b>Potência (W)</b> | <b>Tempo (min)</b> | <b>Temperatura (°C)</b> |
|---------------|---------------------|--------------------|-------------------------|
| 1             | 1000                | 4.5                | 160                     |
| 2             | 0                   | 0.5                | 160                     |
| 3             | 1000                | 5.0                | 230                     |
| 4             | 1000                | 15.0               | 230                     |
| 5             | 0                   | 20.0               | 0                       |

Programa de aquecimento do forno de micro-ondas empregado para a decomposição das amostras. FONTE: NARDI e colaboradores (2009).

Primeiramente foi avaliado o branco da curva e depois as soluções de calibração, sendo o mesmo procedimento realizado para as amostras. Os parâmetros operacionais de aquisição dos dados empregados para detecção do chumbo são indicados na tabela 4, conforme descrito por Baika e colaboradores (2016).

TABELA 4 - PARÂMETROS OPERACIONAIS DO ICP-MS

| Parâmetro                    | Valor                     |
|------------------------------|---------------------------|
| Gerador de radiofrequência   | 27,12 MHz                 |
| Potencia aplicada            | 1.4 kW                    |
| Vazão do gás do plasma       | 18.00 l min <sup>-1</sup> |
| Vazão do gás auxiliar        | 1.80 l min <sup>-1</sup>  |
| Vazão do gás de revestimento | 0.21 l min <sup>-1</sup>  |
| Vazão do gás do nebulizador  | 0.95 l min <sup>-1</sup>  |
| Retardo de estabilização     | 20 s                      |
| Replicata/Amostra            | 8                         |
| Isótopo analisado            | Pb <sup>208</sup>         |
| Padrão interno               | In <sup>115</sup>         |

Parâmetros operacionais do ICP-MS, modelo 820-MS Varian (Mulgrave – Australia). FONTE: BAIKA e colaboradores (2016).

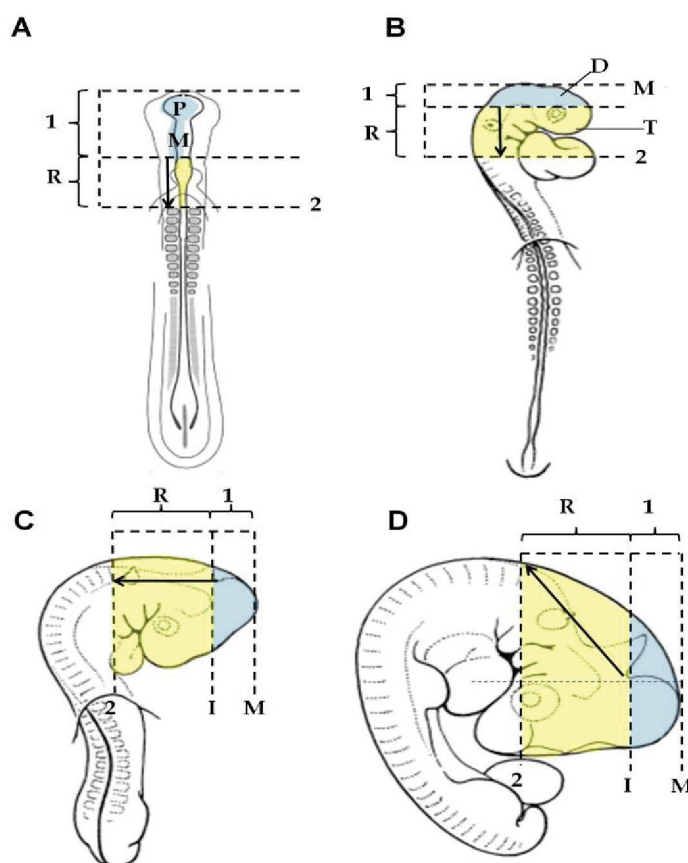
### 3.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA PARA DETERMINAÇÃO DA REGIÃO DOS CORTES

Inicialmente foi realizada a análise morfométrica da região cefálica de embriões entre os estádios 8 e 25 para determinar a região do rombencéfalo da qual seriam feitos os cortes para imunomarcagem e biodisponibilidade do chumbo. Assim, embriões controle incubados e coletados como descrito no item 3.4 foram processados pela técnica da montagem total (ORTOLANI-MACHADO et al., 2012). Os embriões foram imersos em solução fixadora Carnoy (60 % álcool absoluto, 30% clorofórmio e 10% ácido acético glacial) por 2 horas, a temperatura ambiente, em placa de Petri fechada. Depois, foram lavados em água destilada e corados com solução corante Carmalúmen de Mayer, por 48 horas, desidratados em série crescente de etanol - 70%, 90% e 95% (10 minutos cada), 100% I e 100% II (15 minutos cada) - e diafanizados com dois banhos de xilol (10 minutos cada). Para a montagem em lâmina, os embriões foram cobertos com resina Entellan® e lamínula, sendo que a lâmina utilizada foi elevada para permitir que os embriões não ficassem achatados, conservando sua morfologia. Assim, tiras de plástico não sensível ao xilol (embalagem de sorvete) foram previamente coladas nas lâminas.

Após a montagem total, os embriões foram fotografados em câmera Sony Cyber-shot DSC-W55 acoplada ao microscópio estereomicroscópio (Tecnival, SQF-F) e as imagens analisadas utilizando-se o software Image Pro-Plus (MediaCybernetics).

As medidas escolhidas foram baseadas na literatura (KOBUS, 2007; KMECICK, 2017), porém com algumas adaptações uma vez que cada estágio apresenta morfologia própria. Para atingir a altura correta do início do rombencéfalo no corte foi necessário medir a distância entre o prosencéfalo e a segunda constrição das vesículas encefálicas (estádios 8 a 12) (Figura 9A 1), entre o mesencéfalo e a terceira constrição contada a partir do telencéfalo (T) (estádios 12 a 17) (Figura 9B 1) ou entre o mesencéfalo e o istmo (estádios de 18 a 25) (Figura 9C-D 1). As regiões acima estão representadas com a cor azul na figura 9A-D e foram desprezadas durante os cortes. A porção anterior do primeiro somito (Figura 9A-D 2) foi considerada a região final do rombencéfalo. Assim, a porção que foi considerada nos cortes compreendeu toda a extensão do rombencéfalo, representada pela letra R, na figura 9 A-D, área amarela.

FIGURA 9 - ESTABELECIMENTO DAS REGIÕES DE CORTE



Representação esquemática das medidas realizadas nos embriões em diferentes estádios, para determinar a região dos cortes. Embrião no estádio A: 10HH; B: 14HH; C: 18HH e D: 22HH. A área a ser desprezada (área azul) consiste na distância do ápice do prosencéfalo (P) até a segunda região de estreitamento (em A), do mesencéfalo até a terceira região de constrição contada a partir do telencéfalo (T) (em B) e do mesencéfalo (M) até o istmo (I) (em C-D). Esta região é representada pelo número 1. 2: Porção anterior do primeiro somito. R: Extensão do rombencéfalo. Área amarela: Região a ser analisada nos cortes. Seta: Orientação do corte. D: Diencefalo. FONTE: Adaptado de BELLAIRS; OSMOND (2014).

### 3.9 BIODISPONIBILIDADE DO CHUMBO

#### 3.9.1 *Leadmium Green*

O *Leadmium<sup>TM</sup> Green AM dye* é um marcador fluorescente que se associa ao chumbo (LIFE TECHNILOGIES, 2007). O presente trabalho tentou padronizar sua utilização a partir da literatura descrita para outros modelos, como células em cultivo (LI et al., 2012) e plantas (BRUNETTI et al., 2015), devido à falta de protocolos para o emprego do marcador em embriões de ave. Desta forma o presente trabalho propõe um protocolo, que pode ser aplicado não apenas a embriões de ave, mas também a outros organismos embrionários, como por exemplo, *Danio rerio*.

Foram utilizados seis embriões inteiros: dois controles fechados (não injetados), dois controles veículo (injetados com solução fisiológica) e dois expostos (injetados com nitrato de chumbo, 0.015  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  Pb). Para verificar se o espécime não apresentava autofluorescência apenas os controles fechados não receberam o corante.

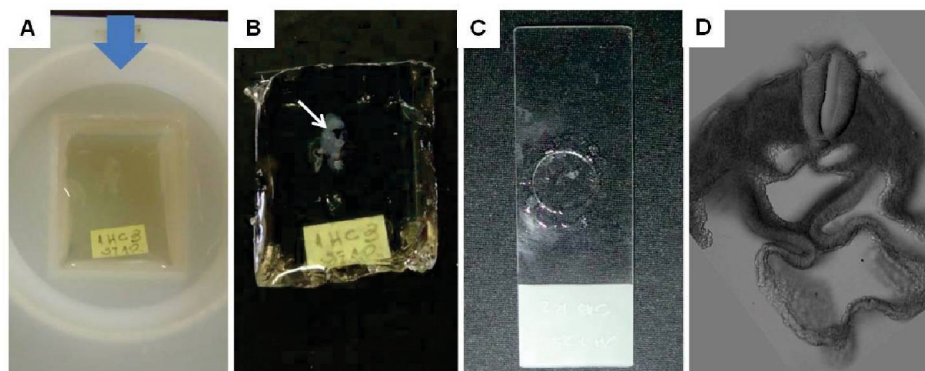
Após 48 horas de incubação foram abertas as janelas nos ovos como descrito anteriormente e adicionados 100 $\mu\text{l}$  do marcador (diluição 1:10, em DMSO) sobre o embrião vivo. A abertura foi fechada com fita adesiva escura e os ovos reincubados. Após 6 horas, os embriões foram retirados dos ovos, lavados em solução salina e colocados em microplaca de 4 poços CellView<sup>TM</sup> (Greiner Bio One International GmbH), com solução salina 0,9%. Todos os procedimentos foram realizados com as luzes do laboratório apagadas para evitar perda de fluorescência.

Para se tentar detectar o chumbo em regiões específicas foi necessário realizar cortes nos embriões. Assim, quatro embriões, sendo dois controles veículo e dois expostos foram marcados com *Leadmium Green*, como descrito acima, e emblocados em gelatina segundo Ortolani-Machado e colaboradores (2012), com modificações. Então, passaram por 3 banhos de sacarose (Sigma Aldrich) 5% e 10%, durante 2 horas em cada banho e em sacarose 15% *overnight*, a 4°C. Posteriormente, os embriões foram embebidos em solução de gelatina 7,5% (Sigma Aldrich) e sacarose 15%, por 4 horas e emblocados em gelatina 15% e sacarose 15% a 37°C. Os embriões foram orientados centralmente nos moldes (Figura 10A-B) de forma que os cortes se iniciassem sempre da região anterior para a posterior do embrião. Os blocos foram mantidos a 4°C, por 12 horas, para que a gelatina polimerizasse por completo. O bloco foi retirado do molde somente no momento do corte. No vibrátomo (Leica Biosystems) foram realizados cortes



transversais seriados com espessura de 70  $\mu\text{m}$ . Os cortes foram montados entre lâmina e lamínula com Gelmount (Figura 10C) e as imagens obtidas no microscópio de varredura a laser confocal (Nikon) (Figura 10D). Todas as soluções foram preparadas com solução fisiológica (NaCl 0,9%) e os embriões e cortes protegidos da luz durante todo o procedimento.

FIGURA 10 - DISPOSIÇÃO DO EMBRIÃO NO MOLDE DE GELATINA E NA LÂMINA HISTOLÓGICA



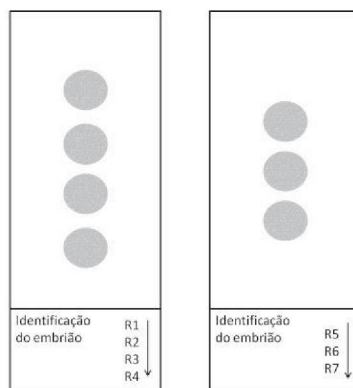
A: Embrião no estágio 10HH colocado no molde com gelatina, região cefálica voltada para região demarcada (seta azul). B: Bloco gelatinizado com embrião (seta) fora do molde. C: Corte entre lâmina e lamínula. D: Imagem obtida no microscópio de varredura a laser confocal para *Leadmium green* (verde), sobreposta a imagem de DIC. FONTE: A autora (2017).

### 3.9.2 Autometalografia

Foram selecionados 20 embriões, coletados com 3 e 4 dias (estádios 20 e 25, aproximadamente), para a técnica de autometalografia (DANSCHER, 1984), sendo 10 do grupo controle e 10 do grupo exposto. Eles foram fixados em paraformaldeído 2%, submetidos à desidratação em banhos crescentes em etanol durante 5 minutos em cada banho e diafanizados em xilol (2 banhos de 5 minutos cada). Foram embebidos em Paraplast (Leica Biosystems Richmond) a 57°C, em dois banhos de 15 minutos cada e incluídos em novo Paraplast, com orientação como descrita no item 3.9.1. Para cada embrião foram produzidas, 12 lâminas, das quais 6 do rombômero (r) 1 a r4 e 6 do r5 ao r7, totalizando 120 lâminas para cada grupo (controle e tratado). Destas lâminas, 60 foram empregadas para autometalografia. O bloco foi trimado e os embriões seccionados no micrótomo (Leica Biosystems). Como cada rombômero nos estádios empregados possui entre 276 $\mu\text{m}$  e 386 $\mu\text{m}$ , foram realizados cortes de 7 $\mu\text{m}$ , sendo retirados em intervalos entre 270 e 380 $\mu\text{m}$  (dependendo do estágio embrionário) para garantir que diferentes rombômeros estivessem sendo coletados. Os cortes foram dispostos sobre as lâminas

previamente recobertas com albumina, de forma que cada corte representasse uma região do rombômero (Figura 11). Os cortes foram distendidos em placa aquecida (37°C) e as lâminas permaneceram guardadas até a realização da autometalografia.

FIGURA 11 - DISPOSIÇÃO DOS CORTES EM LÂMINA HISTOLÓGICA



Identificação dos cortes em lâmina, onde a seta indica a disposição dos cortes. R1-R7: rombômeros de 1 a 7. FONTE: A autora (2017).

Após a remoção do Paraplast com xilol e reidratação em banhos decrescentes de etanol e água destilada, as lâminas permaneceram por 30 minutos na solução de desenvolvimento físico (60% goma arábica, 10% solução tampão citrato de sódio, 15% solução hidroquinona e 15% solução nitrato de prata), na ausência de luz. Depois foram lavadas diversas vezes em água destilada e submetidas à contracoloração com hematoxilina e eosina. Foi feita a desidratação em série crescente de etanol, diafanização com xilol e montagem das lâminas com resina Entellan. A deposição de Pb foi avaliada como positiva quando havia a presença de pontos marrons nas células, indicando a deposição de prata ao redor das partículas de Pb.

As lâminas foram fotografadas no scanner de lâminas (Zeiss), do Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência da UFPR (CTAF-UFPR), acoplada ao microscópio de luz em aumento de 60X e as imagens analisadas utilizando-se o software ImageJ Fiji (National Institutes of Health).

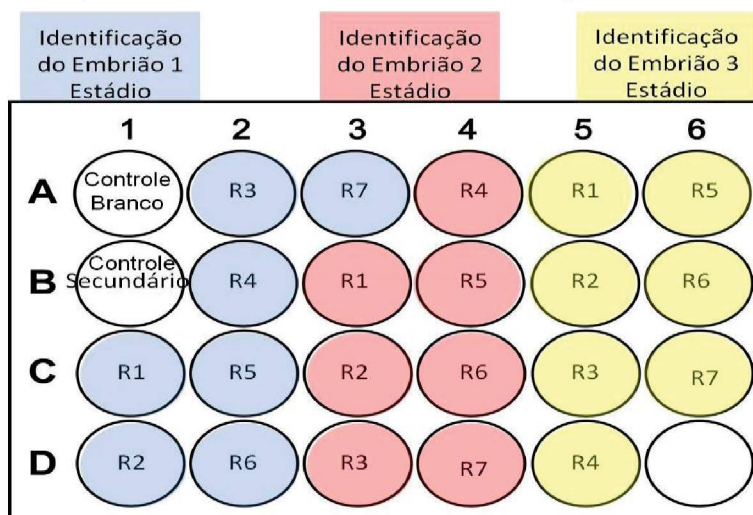
### 3.10 IMUNOMARCAÇÃO

Vinte e cinco embriões controle e vinte e cinco expostos, entre os estádios 8 a 18HH, foram fixados em paraformaldeído 2% por 2 horas, colocados em banhos sucessivos de sacarose, embebidos em solução de gelatina e orientados nos blocos conforme descrito no item 3.9.1, sendo as soluções preparadas em PBS pH 7,4.

Cortes transversais sequenciais de 70  $\mu$ m foram obtidos no vibrátomo (Leica Biosystems), sendo que o número de cortes variou para cada estágio embrionário conforme a espessura média dos rombômeros.

Durante a microtomia, os dois cortes anteriores à região do rombencéfalo do primeiro embrião de cada experimento foram retirados e colocados nos primeiros poços da placa. O primeiro poço corresponde ao controle Branco, que recebeu apenas o DAPI (intercalante de DNA), e o segundo controle secundário que não recebeu o anticorpo primário. Em cada estágio foram selecionados entre 2 e 4 embriões. Os cortes foram coletados em placas estéreis de 24 poços (Kasvi) com PBS e mantidos, na geladeira, por até 12 horas para marcação futura. Na placa foi identificado o número do embrião, estágio e secção correspondente a cada rombômero (Figura 12).

FIGURA 12 - DISPOSIÇÃO DOS CORTES EM PLACA DE 24 POÇOS



1-6: Número de colunas na placa. A-D: Número de linhas na placa. R1 - R7: Rombômeros de 1 a 7. FONTE: A autora (2017).

O protocolo de imunomarcção foi adaptado de Trindade e colaboradores (2012) para realização da técnica *Free Floating*. Os cortes foram deixados à temperatura ambiente por 15 minutos, lavados em PBS, refixados com paraformaldeído 2% durante 10 minutos, lavados com PBS/glicina 0,1M e submetidos ao bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS e soro albumina bovina (BSA) 1% com Triton X-100 0,3% (Sigma Aldrich), por 4 horas, em agitador magnético (Scienware). A seguir foram incubados com o anticorpo (IgM) anti-HNK-1 de galinha produzido em camundongo (específico para células da crista neural) não diluído, *overnight*, a 4°C, em câmara úmida. Alguns cortes foram utilizados como controle, sendo incubados somente com PBS.



No dia seguinte, os cortes foram lavados com PBS contendo BSA 1% e Triton-X100 e incubados com o anticorpo secundário para HNK-1, anti-IgM de camundongo produzido em cabra, conjugado a rodamina (EMD Millipore Corporation), na concentração de 1:100 em PBS, por 1 hora e trinta minutos. Vinte minutos antes do término da incubação com anticorpo secundário foram adicionados 25 µL de solução de DAPI (Santa Cruz Biotechnology), na concentração 100ng.ml<sup>-1</sup>. Então, foram lavados em PBS e montados com Gelmount. As lamínulas foram seladas com esmalte e as imagens obtidas em microscópio de varredura a laser confocal, modelo A1SiR+MP (Nikon Corporation, Tokio, Japão).

Para a análise das células da crista neural cefálica foram avaliados dois parâmetros. O primeiro foi a intensidade relativa de fluorescência, que determina a relação entre intensidade de fluorescência e a área do corte analisado. Este parâmetro foi adaptado a partir de trabalhos anteriores (LI et al., 2016; WHANG et al., 2016; ZHANG, P. et al., 2017). O segundo parâmetro mediu a distância linear projetada do ápice do tubo neural dorsal até as células da crista neural laterais mais distantes, para avaliar a migração das células, sendo o procedimento adaptado de Rovasio e Battiato (2002).

Resumidamente, a tabela 5 indica o número de embriões utilizados neste trabalho, por metodologia empregada.

TABELA 5 - NÚMERO DE EMBRIÕES POR METODOLOGIA

| Tratamento                               | Mortalidade | Metodologia       |         |                  |                       |                    |
|------------------------------------------|-------------|-------------------|---------|------------------|-----------------------|--------------------|
|                                          |             | Análise anatômica | Química | Autometalografia | <i>Leadmium green</i> | Imunofluorescência |
| <b>Controle</b><br>(Solução fisiológica) | 224         | 150               | 30      | 10               | 4                     | 25                 |
| <b>Exposto</b><br>(Nitrato de Pb)        | 230         | 112               | 30      | 10               | 4                     | 24                 |
| <b>Controle fechado</b>                  |             |                   |         |                  | 2                     |                    |

FONTE: A autora (2018).

### 3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados no software GraphPad Prism 6.0.



Para a análise da ocorrência de mortalidade e malformações entre os grupos foi utilizado o teste de análise de variância de duas vias (*Two-way ANOVA*), seguido pelo teste de Bonferroni.

Os dados obtidos a partir da análise das células da crista neural imunomarcadas e autometalografia foram submetidos ao teste de D'agostino-Pearson ou Kolmogorov-Smirnov, dependendo do "n" amostral obtido. Posteriormente aos testes de normalidade foi utilizado teste de análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*), com pós-teste de Tukey para dados com distribuição normal. Para dados que não apresentaram distribuição normal foi empregado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn, quando aplicável.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 MORTALIDADE

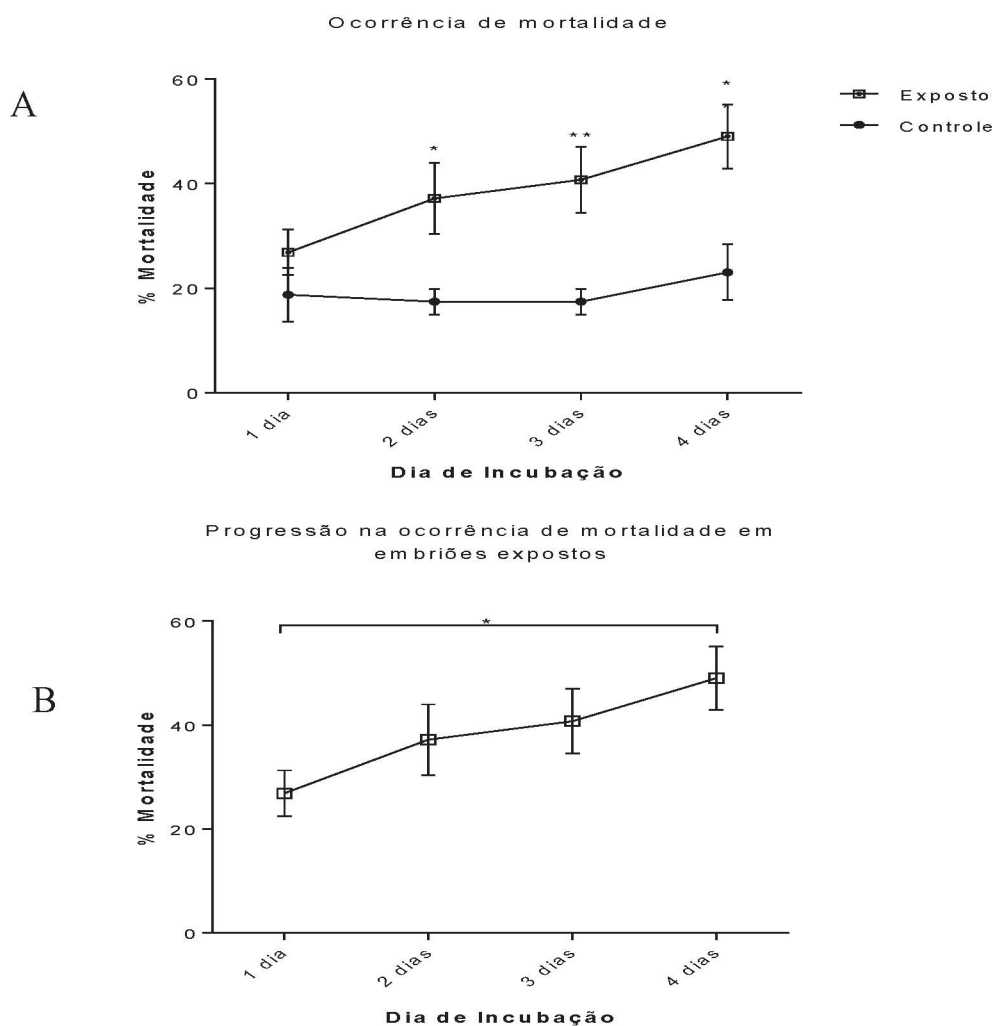
No grupo controle foi observada ocorrência de mortalidade entre 18 e 21%, em diferentes tempos de incubação. A exposição ao chumbo afetou a sobrevivência dos embriões em diferentes tempos, onde se nota uma tendência ao aumento da mortalidade em relação ao tempo de incubação (Tabela 6). A ocorrência da mortalidade dos expostos foi significativamente maior que a dos controles em 2, 3 e 4 dias, sendo mais acentuada em 3 e 4 dias (Figura 13A) e o aumento na ocorrência de mortalidade foi progressivo ao longo do tempo (Figura 13B).

TABELA 6 - EMBRIÕES VIVOS E MORTOS POR DIA DE INCUBAÇÃO

| Classificação | 1 Dia          | 1 Dia          | 2 Dias         | 2 Dias        | 3 Dias         | 3 Dias           | 4 Dias         | 4 Dias         |
|---------------|----------------|----------------|----------------|---------------|----------------|------------------|----------------|----------------|
|               | Controle       | Exposto        | Controle       | Exposto       | Controle       | Exposto          | Controle       | Exposto        |
| Vivos         | 47<br>(78,33%) | 42<br>(70%)    | 46<br>(76,67%) | 35<br>(58,33) | 48<br>(80%)    | 32<br>(53,33%)   | 44<br>(73,33%) | 29<br>(48,33%) |
| Mortos        | 11<br>(18,33%) | 16<br>(26,67%) | 11<br>(18,33%) | 21<br>(35%)*  | 10<br>(16,67%) | 22<br>(36,67%)** | 13<br>(21,67%) | 27<br>(45%)**  |

Resultado significativamente diferente do controle \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ). Média. ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Ovos por grupo: n=60. Não estão indicados na tabela os que não retomaram o desenvolvimento. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 13 - OCORRÊNCIA E PROGRESSÃO DE MORTALIDADE DOS EMBRIÕES EM DIFERENTES DIAS DE INCUBAÇÃO



Resultado significativamente diferente do controle \*( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ). Média e erro padrão. ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Controle 1 dia  $n = 58$ . Exposto 1 dia  $n = 58$ . Controle 2 dias  $n = 57$ . Exposto 2 dias  $n = 56$ . Controle 3 dias  $n = 58$ . Exposto 3 dias  $n = 54$ . Controle 4 dias  $n = 57$ . Exposto 4 dias  $n = 56$ . FONTE: A autora (2017).

## 4.2 ANÁLISE ANATÔMICA

Durante a coleta dos embriões foram realizadas análises anatômicas de acordo com as características descritas por Hamburger e Hamilton (1951), conforme o estágio de desenvolvimento encontrado. Nos embriões injetados com solução fisiológica (controle) são observadas alterações anatômicas, chegando até 17%, aproximadamente. Já em todos os grupos expostos foram identificados embriões malformados. Apesar de alguns apresentarem intensas malformações, impedindo seu estadiamento, estes foram incluídos na figura 14 como totalmente alterados e na taxa de malformações (Figura 15) como dias de incubação e não por seu estágio de desenvolvimento específico. O número de embriões

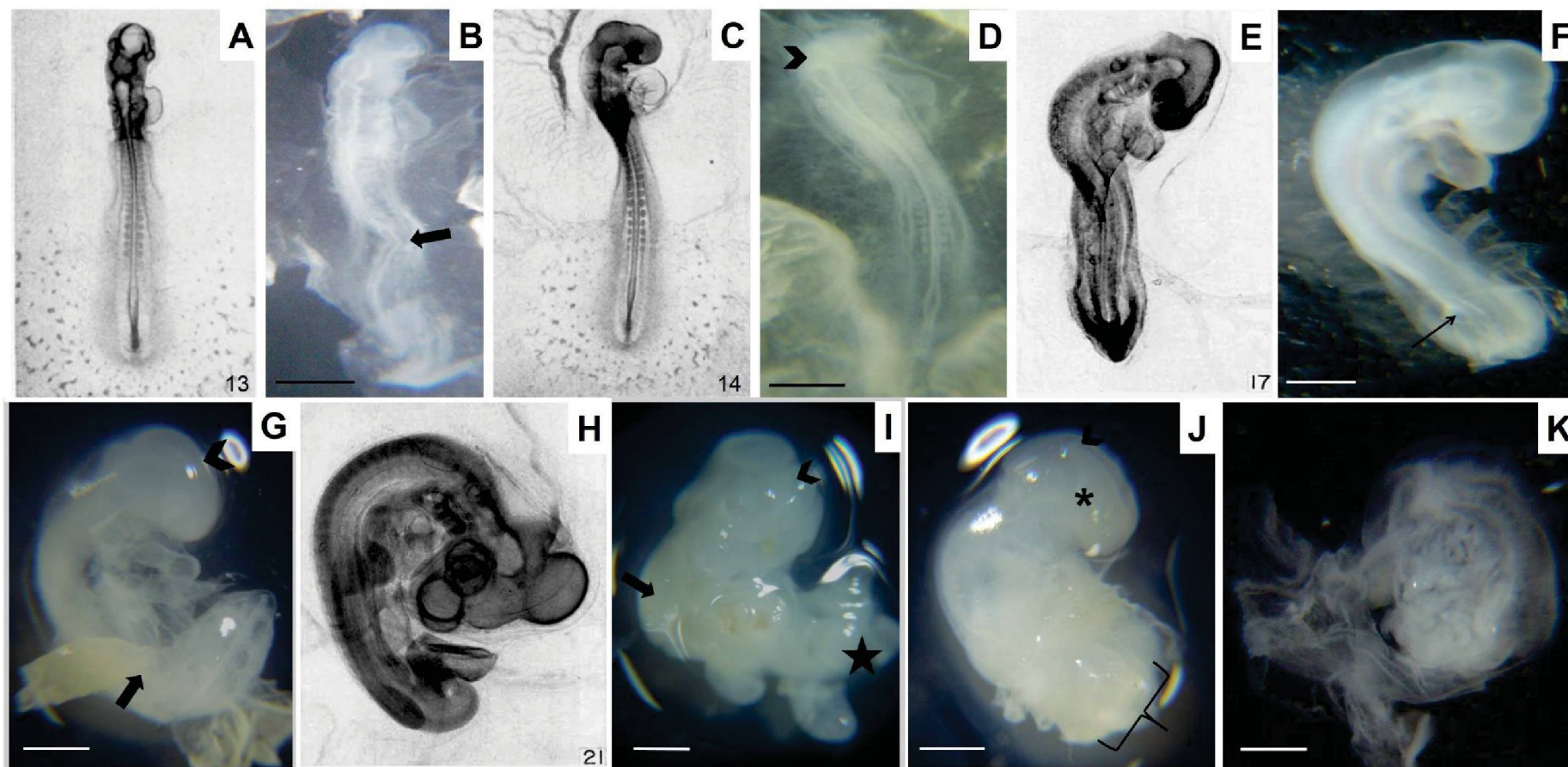
dentro dos padrões normais de desenvolvimento e com alterações está indicado na tabela 7.

Nos embriões no estágio 13 HH do grupo exposto, quando comparados ao padrão normal (Figura 14A), foram encontradas alterações na orientação do corpo (Figura 14B). No estágio 14 HH os embriões normais (Figura 14C) apresentam flexura cefálica evidente, diferente do observado em alguns embriões expostos (Figura 14D). Com a progressão do desenvolvimento também foram identificadas, se comparadas com o padrão normal (Figura 14E), malformações na região cefálica (vesículas encefálicas pouco delimitadas), fechamento incompleto do tubo neural e curvatura incorreta do corpo (Figura 14F e G). Em estádios mais tardios essas alterações tornam-se mais evidentes, sendo verificada, em relação ao embrião normal (Figura 14H), curvatura incorreta do corpo, malformações cefálicas e região caudal encurtada (Figura 14I). Outros apresentavam, além das alterações descritas, ausência das vesículas ópticas (anofthalmia), do broto da cauda (Figura 14J) e hemorragias. Alguns embriões apresentaram severas malformações (Figura 14K), impossibilitando o estadiamento da fase de desenvolvimento em que se encontravam.

Nossos resultados mostram uma grande incidência de formação aberrante da região cefálica e de pontos hemorrágicos. Apesar de todos os grupos exibirem malformações, apenas os grupos dos embriões com 3 e 4 dias de incubação apresentaram aumento na ocorrência de malformações estatisticamente significativa em relação ao controle (Figura 15A). Porém, observa-se uma progressão no número de embriões malformados em decorrência do tempo de incubação (Figura 15B).



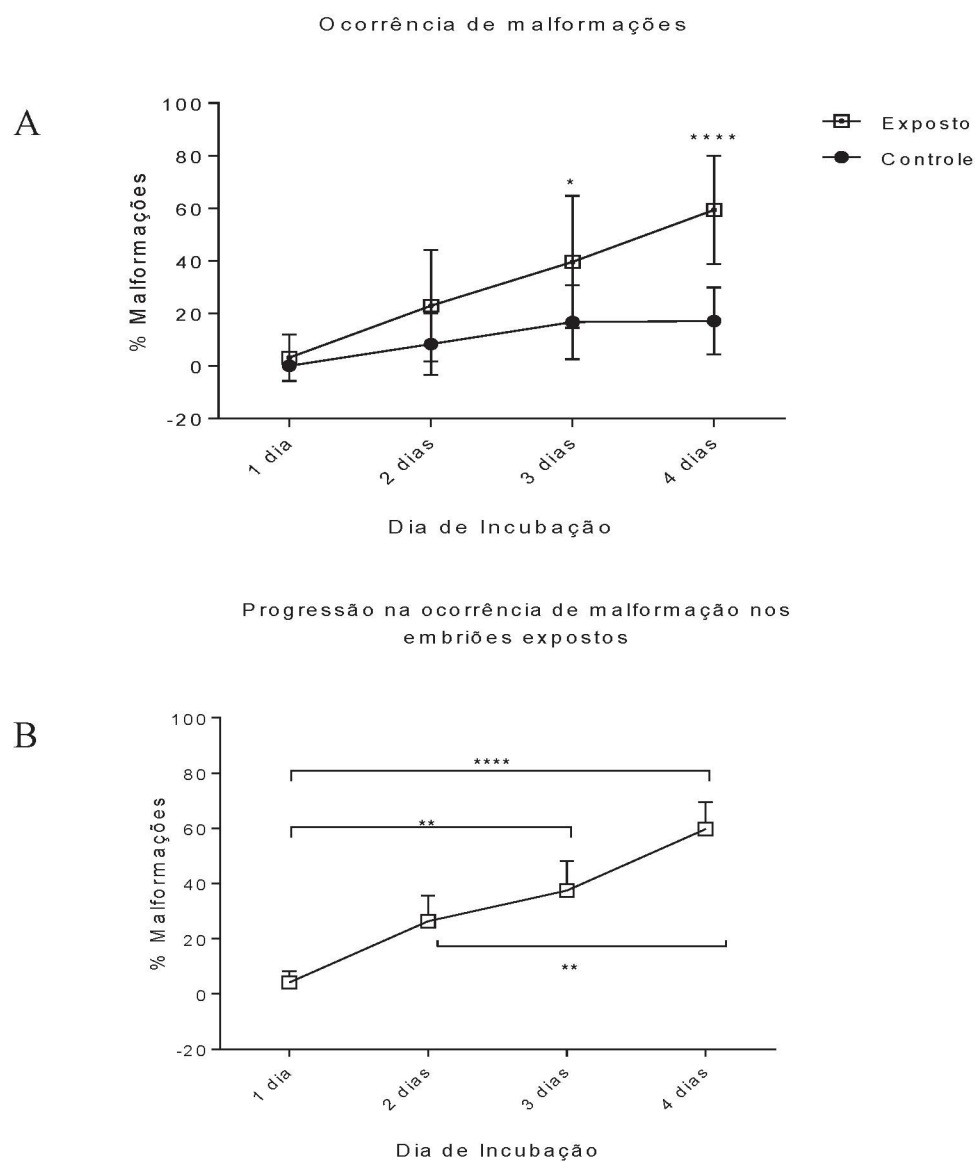
FIGURA 14 - ANÁLISE ANATÔMICA DOS EMBRIÕES EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO



A e B: 13 HH (48-52 horas); C e D: 14 HH (50-53 horas); E-G: 17HH (52-64 horas); H-I: 21 HH; J: 3 dias de incubação; K: 2 dias de incubação A, C, E e H: Padrão normal de desenvolvimento para os estádios 13, 14, 17 e 21 HH, respectivamente (HAMBURGUER; HAMILTON, 1951). Seta larga: Curvatura anormal do corpo. Cabeça de seta: Alterações na região cefálica. Seta: Fechamento incompleto do tubo neural. Estrela: Encurtamento do broto da cauda. Asterisco: Ausência das vesículas ópticas. Chave: Ausência do broto da cauda. Barra = 1 cm FONTE: A autora (2017).



FIGURA 15 - OCORRÊNCIA E PROGRESSÃO DE MALFORMAÇÕES DOS EMBRIÕES EM DIFERENTES DIAS DE INCUBAÇÃO



Resultado significativamente diferente do controle  $*(p < 0,05)$ .  $****(p < 0,001)$ . Média e erro padrão. ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Controle 1 dia  $n = 29$ . Exposto 1 dia  $n = 27$ . Controle 2 dias  $n = 39$ . Exposto 2 dias  $n = 29$ . Controle 3 dias  $n = 41$ . Exposto 3 dias  $n = 29$ . Controle 4 dias  $n = 41$ . Exposto 4 dias  $n = 27$ . FONTE: A autora (2017).

TABELA 7 - EMBRIÕES DENTRO DA NORMALIDADE E ALTERADOS

|                  | 1 Dia<br>Controle | 1 Dia<br>Exposto | 2 Dias<br>Controle | 2 Dias<br>Exposto | 3 Dias<br>Controle | 3 Dias<br>Exposto | 4 Dias<br>Controle | 4 Dias<br>Exposto |
|------------------|-------------------|------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Embriões         | 29                | 27               | 39                 | 29                | 41                 | 29                | 41                 | 27                |
| Alterados<br>(n) | 0                 | 1                | 3                  | 7                 | 5                  | 10                | 7                  | 15                |
| Alterados<br>(%) | 0                 | 3,7              | 7,7                | 24,1              | 12,2               | 34,5*             | 17,1               | 59,2****          |

Resultado significativamente diferente do controle \*( $p < 0,05$ ), \*\*\*\*( $p < 0,001$ ). Média. ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. FONTE: A autora (2017).

#### 4.3 QUANTIFICAÇÃO DE CHUMBO NOS EMBRIÕES DE AVE

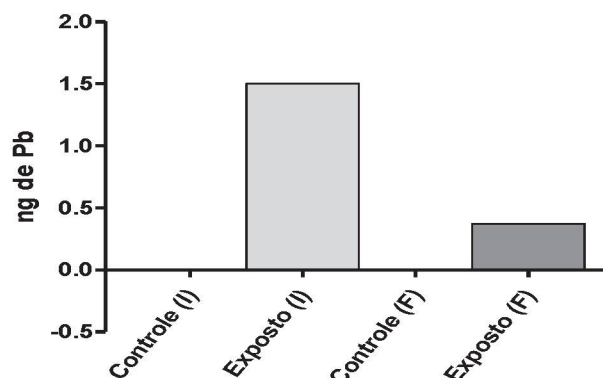
A quantidade de Pb foi medida nos embriões inteiros com um ICP-MS, visto que essa técnica apresenta alta sensibilidade e abrange baixos limites de detecção ( $0,0001 \mu\text{g.ml}^{-1}$  Pb), duas características necessárias para a detecção do metal em nossas amostras. Porém, apesar da sensibilidade da técnica, não foi possível realizá-la em embriões nos estádios mais iniciais, pois seria necessário um número muito grande desses devido ao seu pequeno tamanho.

Inicialmente foi realizada a análise de repetição dos materiais de referência, que mostrou boas recuperações (95% e 105%), indicando a confiabilidade do nosso resultado. O peso das amostras úmidas (pools) controle e tratado foram de 1,300g a 0,800g, respectivamente.

Através do peso molecular do nitrato de chumbo a  $0,025 \mu\text{g.ml}^{-1}$  sabe-se que na solução utilizada encontra-se  $0,015 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de Pb, ou seja, 1,5 ng de chumbo por ovo. Esta informação é necessária pois no aparelho foi realizada a quantificação do metal e não de seu sal.

Na amostra exposta ao Pb, analisada no ICP-MS, foi detectado  $13,4 \mu\text{g Pb.kg}^{-1}$ . Sendo assim, estima-se, a partir do peso do pool de embriões entre o 3º e 4º dia de incubação (0,800g), que cada embrião apresenta em média 0,37 ng de Pb (Figura 16). Esse valor corresponde a aproximadamente 25% da concentração inicial a qual os embriões foram expostos. Na amostra controle não foi detectada a presença de Pb.

FIGURA 16 - QUANTIDADE DE Pb INSERIDO E DETECTADO



Diferença entre quantidade de Pb inserida nos ovos antes da incubação (I) e quantificação nos embriões após o 3° e 4° dia de incubação (F). Controle (I): 0 ng. Exposto (I): 1,5 ng. Controle (F): 0 ng. Exposto (F): 0,37 ng. FONTE: A autora (2018).

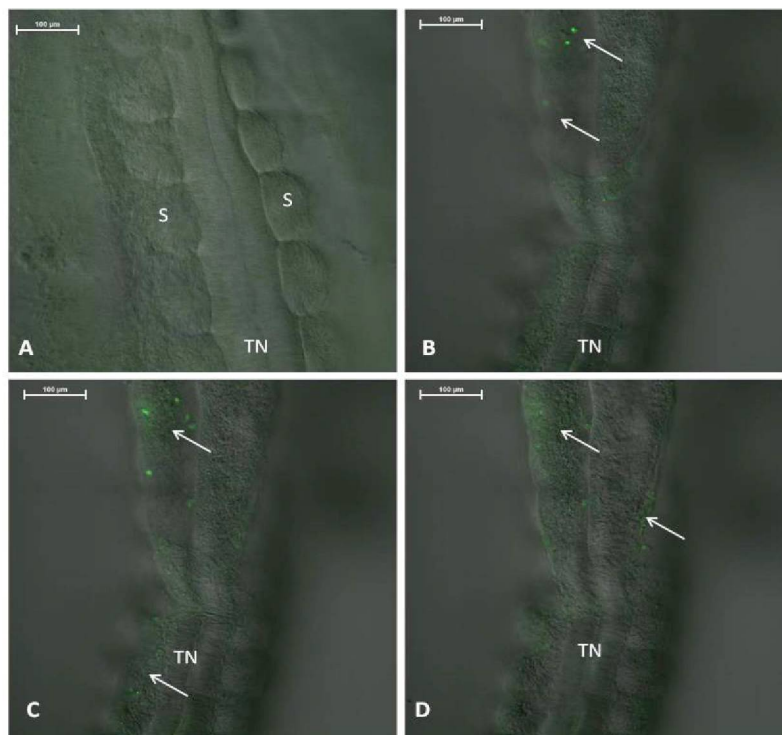
#### 4.4 BIODISPONIBILIDADE DO CHUMBO EM EMBRIÕES DE AVE

##### 4.4.1 *Leadmium Green*

A utilização do marcador fluorescente *Leadmium Green* permite detectar se o chumbo está ou não atingindo o embrião.

Em nosso trabalho, inicialmente, foi observado o embrião de 3 dias cujo ovo não foi injetado (controle fechado) para confirmar que o mesmo não apresentava autofluorescência. Assim, nem no embrião controle fechado (que não recebeu o marcador) e nem no controle veículo (Figura 17A) foram encontradas marcações positivas para o chumbo. Já nos embriões expostos foram observados pontos fluorescentes, principalmente nos somitos e tubo neural (Figura 17B-D), indicando que o Pb atingiu o embrião.

FIGURA 17 - BIODISPONIBILIDADE DE CHUMBO EM EMBRIÕES DE AVE

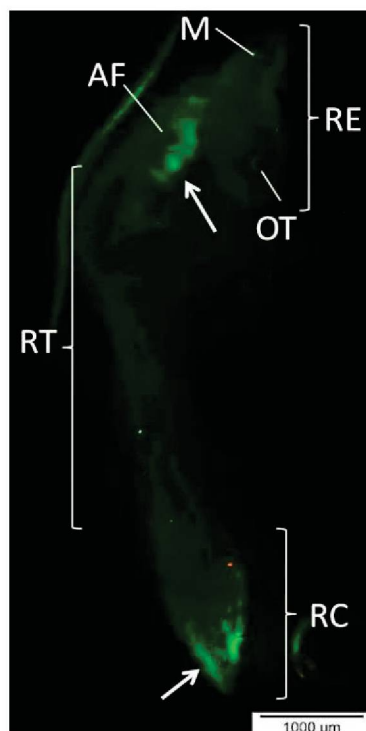


Embriões de *Gallus gallus* com 3 dias de incubação, região do tronco, marcados com *Leadmium*<sup>TM</sup> *Green* AM dye (excitação 490nm, emissão 520nm). A: Controle veículo, sem marcação. B-D: Exposto ao chumbo, em diferentes planos focais, onde é observada marcação positiva para o Pb (setas). TN: tubo neural. S: somito. Imagens obtidas em microscopia de varredura a laser confocal para *Leadmium green* (verde), sobreposta a imagens de DIC. FONTE: A autora (2017).

Ao avaliar o embrião exposto em microscópio de epifluorescência nota-se marcação positiva para o chumbo mais acentuada na região dos arcos branquiais (região cefálica) e porção caudal (Figura 18), indicando a biodisponibilidade do metal nessas regiões. Destaca-se que a avaliação da localização do Pb no embrião inteiro é inédita na literatura, sendo este o primeiro trabalho a apresentar a utilização do marcador para essa finalidade.



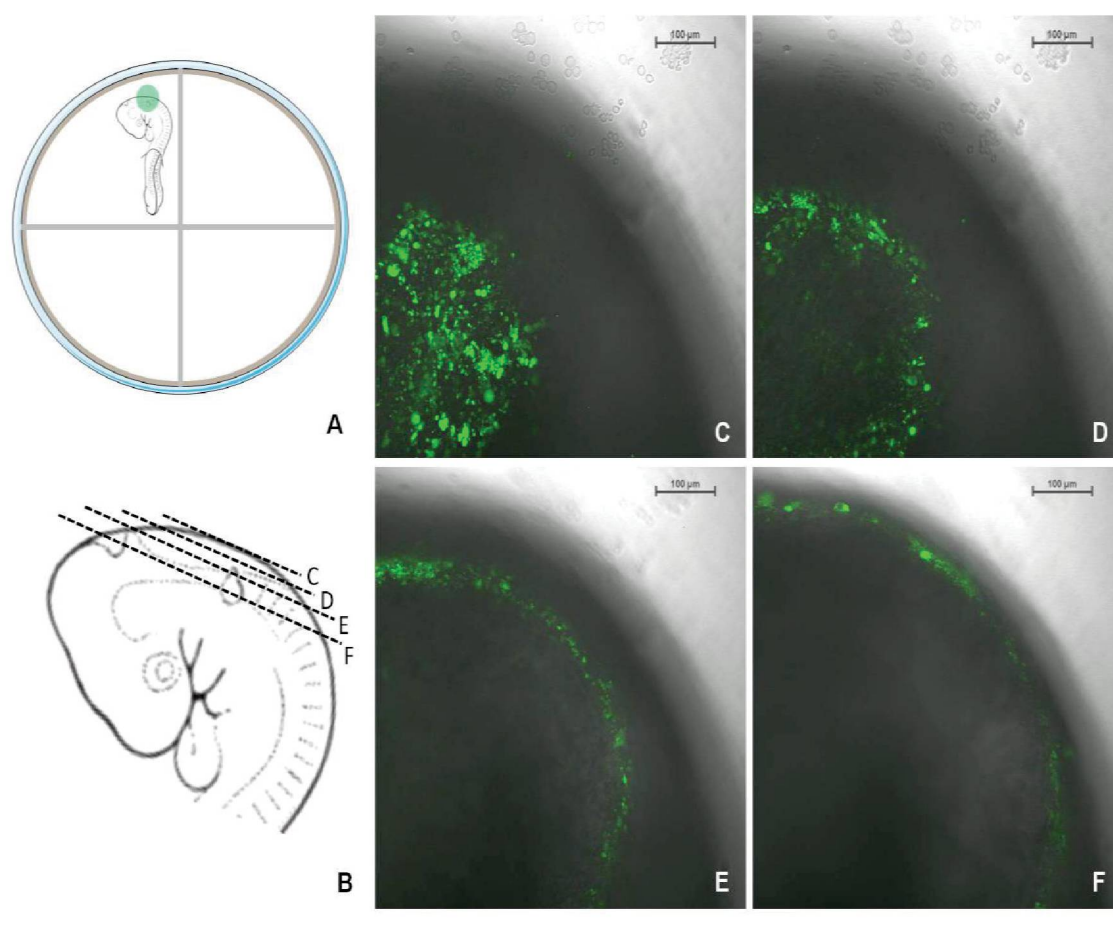
FIGURA 18 – DISTRIBUIÇÃO DO CHUMBO EM EMBRIÃO DE AVE



Embrião de *Gallus gallus* exposto ao chumbo com 3 dias de incubação. As setas indicam as regiões com maior incidência de fluorescência positiva para o Pb. RE: região cefálica. RT: região do tronco. RC: região caudal. M: mesencéfalo. OT: vesícula óptica. AF: arcos branquiais. Imagens obtidas em microscópio de epifluorescência para *Leadmium green* (verde). FONTE: A autora (2017).

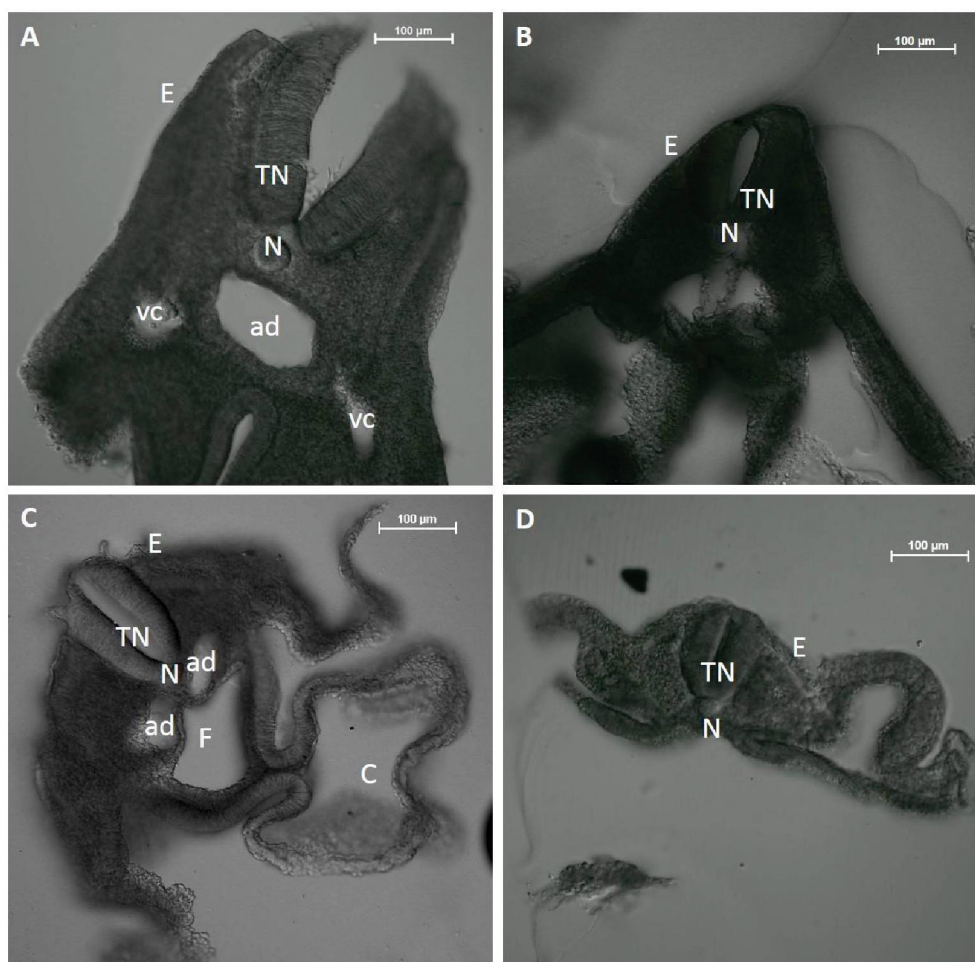
Na figura 19A e B estão esquematizados, respectivamente, o embrião na microplaca (com a região da aquisição das imagens marcada) e a representação esquemática das secções ópticas observadas. Ao avaliar especificamente a região cefálica em maior aumento (20X) foi observada marcação variável dependendo da secção óptica (Figura 19C-F). Porém, não foi possível identificar a marcação em células específicas, o que representou um fator limitante da metodologia. Assim, a região cefálica dos embriões foi cortada após marcação para tentar localizar mais especificamente o Pb nas células. Como resultado, não foram identificados pontos ou regiões marcadas nos embriões controle fechado e veículo (Figura 20A-B, respectivamente), como esperado, mas também não houve marcação positiva para Pb nos expostos (Figura 20C-D).

FIGURA 19 - BIODISPONIBILIDADE DE CHUMBO NA REGIÃO CEFÁLICA DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus* COM 3 DIAS DE INCUBAÇÃO



Diferentes secções da mesma região, mostrando a marcação superficial restrita a porção externa do embrião. A: Modelo esquemático do embrião em microplaca. Círculo verde: Região da aquisição das imagens. B: Representação esquemática das secções ópticas observadas. C-F: secção com 12  $\mu\text{m}$ , 21  $\mu\text{m}$ , 63  $\mu\text{m}$  e 126  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Imagens obtidas em microscopia de varredura a laser confocal para *Leadmium green* (verde), sobreposta a imagens de DIC. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 20 - BIODISPONIBILIDADE DO CHUMBO EM CORTES DE EMBRIÕES COM 3 DIAS DE INCUBAÇÃO



A: Controle fechado; B: Controle veículo; C-D: Exposto. Imagens obtidas em microscopia de varredura a laser confocal para *Leadmium green* (verde), sobreposta a imagens de DIC. TN: Tubo neural. N: Notocorda. E: Ectoderme. F: Faringe. ad: Aorta dorsal. vc: Veia cardinal. C: Coração. FONTE: A autora (2017).

#### 4.4.2 Autometalografia

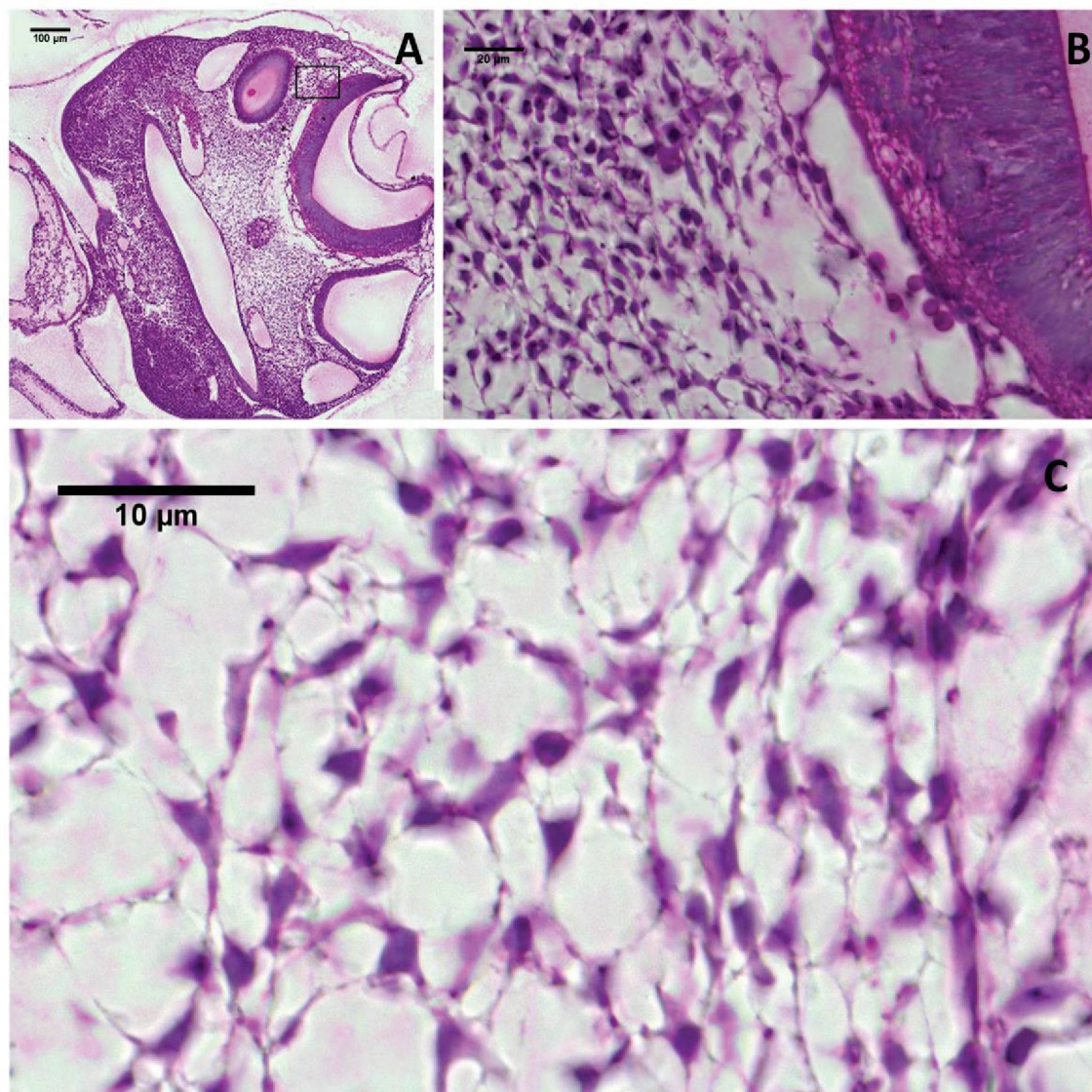
Uma vez que a utilização do marcador fluorescente *Leadmium Green* não apresentou os resultados esperados, optamos por empregar a técnica de autometalografia devido à necessidade de identificar e quantificar as células que estão sendo expostas ao chumbo e estabelecer, assim, a correlação com as células da crista neural ou com sua rota migratória.

Após a captura das imagens, foram quantificadas as células que apresentavam marcação castanha ou enegrecida. Nas amostras controle não foram identificadas células marcadas e nem acúmulos celulares (Figura 21). Nos expostos, as marcações foram observadas no núcleo e/ou citoplasma (Figura 22), indicando a presença de chumbo nas células. Em alguns cortes foram encontrados acúmulos celulares anormais na luz do tubo



neural, sendo que algumas de suas células apresentavam marcação sutil para a presença de Pb (Figura 23).

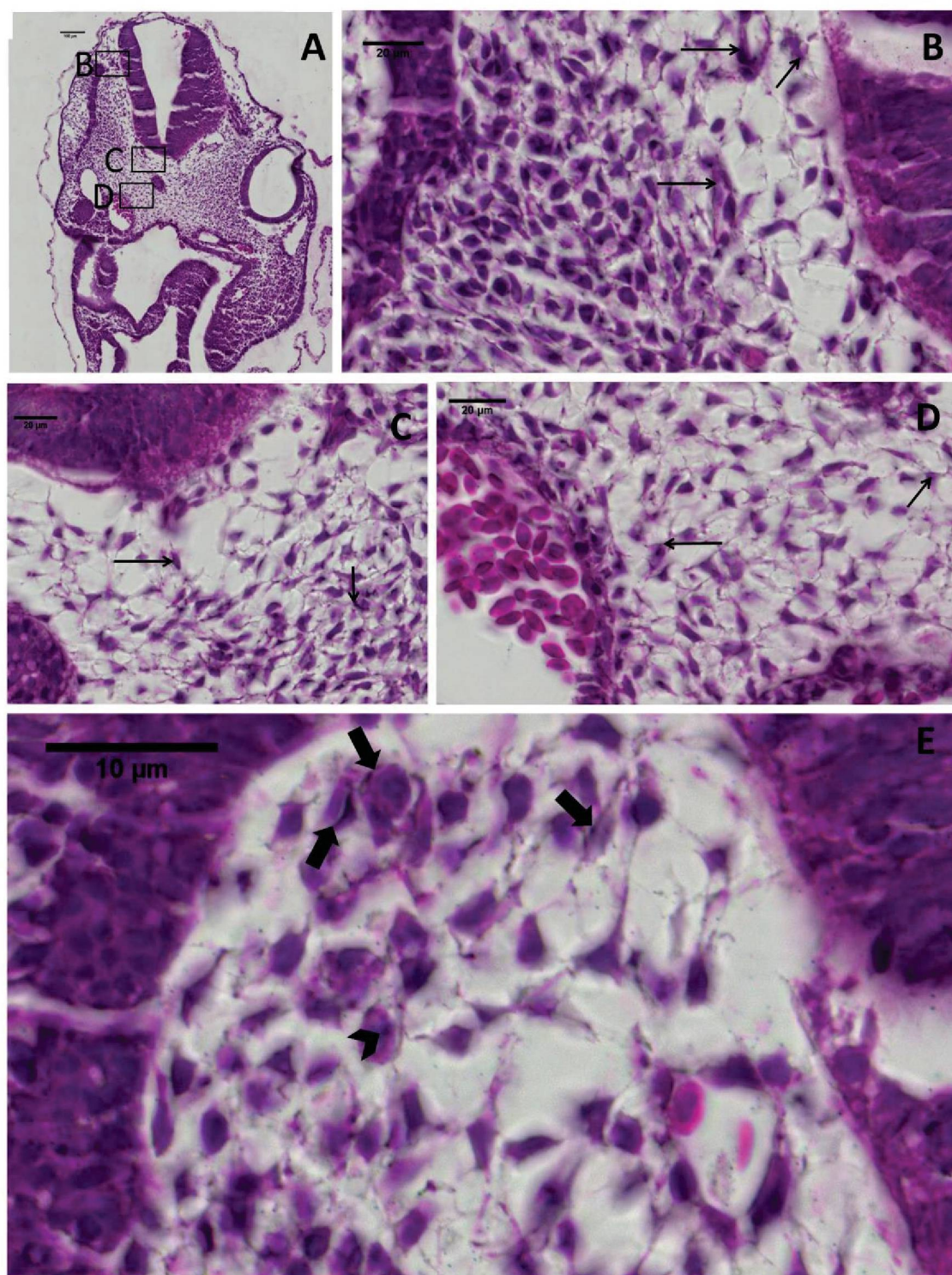
FIGURA 21 - AUTOMETALOGRAFIA EM EMBRIÃO CONTROLE, CORTE AO NÍVEL DE R5



Embrião com 3 dias de incubação. A: imagem total do corte transversal, onde o quadro representa a imagem em maior aumento em B e C. Não são observadas células marcadas. Contracoloração: HE. n= 10 embriões por grupo/ 3 cortes por embrião para cada rombômero (obtidos a partir de 8 experimentos independentes). FONTE: A autora (2017).



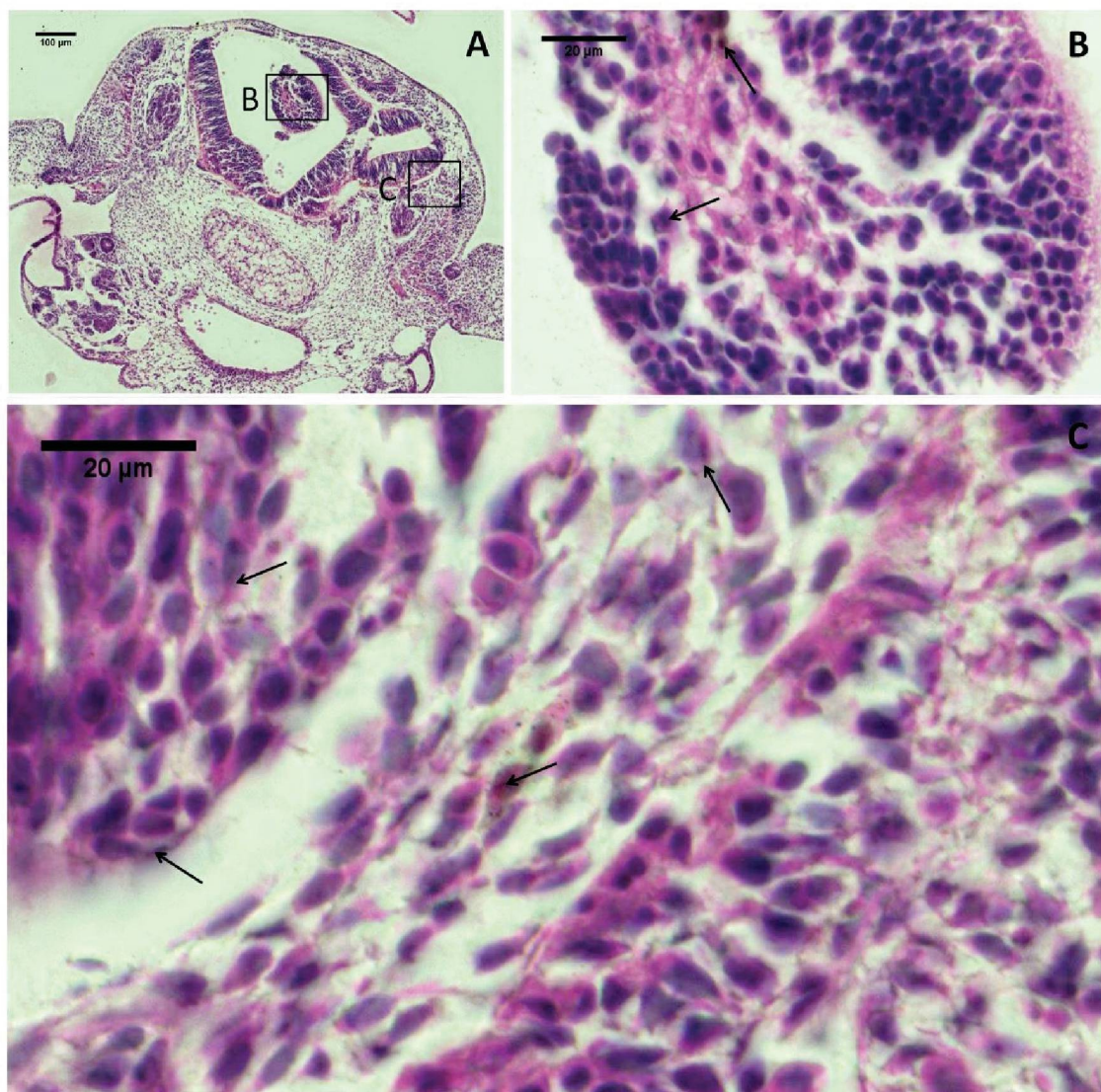
FIGURA 22 - DEPOSIÇÃO DE CHUMBO EM EMBRIÃO EXPOSTO, CORTE AO NÍVEL DE R7



Embrião com 3 dias de incubação. A: imagem total do corte transversal, onde os quadros B-D representam as imagens em maior aumento em B, C e D, respectivamente. B-D: observam-se células marcadas (setas). E: Setas largas: marcação positiva para Pb no citoplasma da célula. Cabeça de seta: Marcação nuclear. Técnica de autometalografia. Contracoloração: HE. n= 10 embriões por grupo/ 3 cortes por embrião para cada rombômero (obtidos a partir de 8 experimentos independentes). FONTE: A autora (2017).



FIGURA 23 - DEPOSIÇÃO DE CHUMBO EM EMBRIÃO EXPOSTO, CORTE AO NÍVEL DE R6



Embrião com 3 dias de incubação. A: imagem total do corte transversal, onde os quadros B e C representam as imagens em maior aumento em B e C, respectivamente. Observa-se agrupamento (quadrado B) celular na luz do tubo neural. B: Grupamento celular em maior aumento, com presença de algumas células marcadas (setas). C: Porção adjacente ao tubo neural, também com células positivas para presença de Pb (setas). Técnica de autometalografia. Contracoloração: HE. n= 10 embriões por grupo/ 3 cortes por embrião para cada rombômero (obtidos a partir de 8 experimentos independentes). FONTE: A autora (2017).

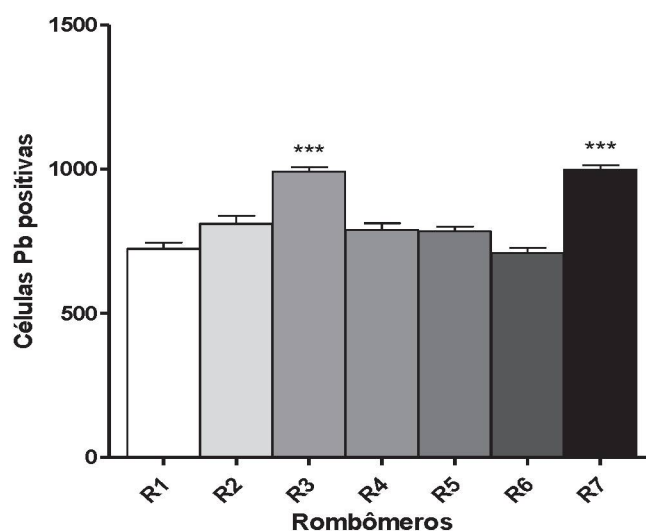
O número de células marcadas foi estimado por corte (r1 a r7) e os resultados estão compilados na tabela 8. Apesar da análise química ter detectado pouca quantidade de Pb nos embriões expostos, foram observados depósitos do metal em todos os rombômeros analisados, sendo que a maior deposição de Pb ocorreu ao nível de r3 e r7 (Figura 24). Apesar da diferença na quantificação de células positivas para Pb, não foram identificadas regiões específicas de deposição.

TABELA 8 – MÉDIA DO NÚMERO DE CÉLULAS MARCADAS AO NÍVEL DOS ROMBÔMEROS NOS EMBRIÕES EXPOSTOS

| Secção | Média de Células Marcadas (n) |
|--------|-------------------------------|
| R1     | 723,9                         |
| R2     | 810,3                         |
| R3     | 991,9                         |
| R4     | 789,2                         |
| R5     | 783,9                         |
| R6     | 708,6                         |
| R7     | 998,1                         |

FONTE: A autora (2017).

FIGURA 24 - BIODISPONIBILIDADE DE CHUMBO AO NÍVEL DOS DIFERENTES ROMBÔMEROS

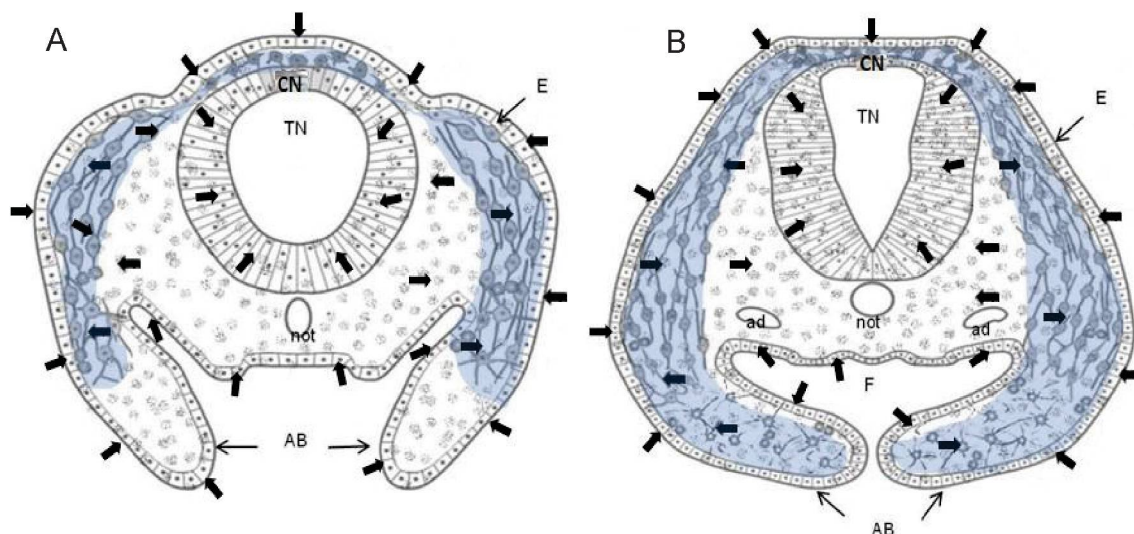


Número de cortes por embrião com 3 dias de incubação = 30. \*\* ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Média e erro padrão. ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. FONTE: A autora (2018).

Ao construir os mapas de biodisponibilidade não evidenciamos uma relação entre a deposição de chumbo e as rotas migratórias das células da crista neural cefálica (Figura 25). As células marcadas encontraram-se amplamente distribuídas no tecido, sendo evidentes no mesênquima, tubo neural e ectoderma superficial. As células com depósitos de Pb presentes no tubo neural não foram quantificadas, visto que as características deste epitélio inviabilizaram a quantificação de células individuais.



FIGURA 25 - RELAÇÃO ENTRE A ROTA MIGRATÓRIA DAS CÉLULAS DA CN CEFÁLICA E A BIODISPONIBILIDADE DE CHUMBO AO NÍVEL DOS ROMBÔMEROS 2 E 6 NO ESTÁDIO 14HH



Mapa de biodisponibilidade do chumbo. A: Rombômero 2. B: Rombômero 6. CN: Crista Neural. TN: Tubo neural. not: Notocorda. F: Faringe. ad: Aorta dorsal. AB: Arcos branquiais. Setas largas: Deposição de chumbo. Área azul: Rota migratória de células da crista neural cefálica. FONTE: Adaptado de KULESA e colaboradores (2010).

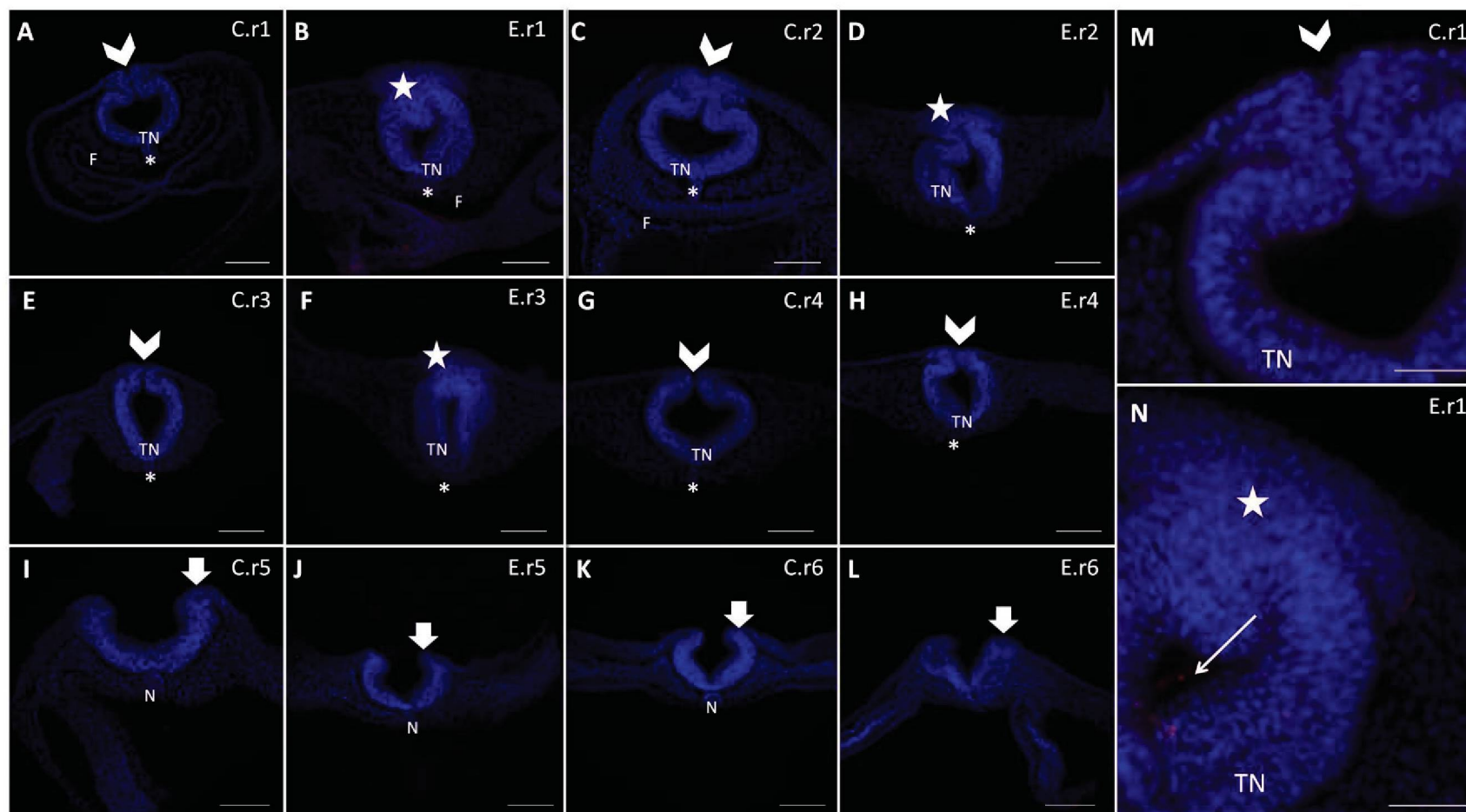
#### 4.5 DISTRIBUIÇÃO E MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL CEFÁLICA

A imunomarcagem utilizando o anticorpo anti-HNK-1 tem proporcionado o mapeamento das células da crista neural e suas rotas de migração (GIOVANNONE et al., 2015; BRONNER; SIMÕES-COSTA, 2016). Neste trabalho, a coloração imunofluorescente foi realizada para revelar a expressão de HNK-1 em células da crista neural cefálica após a exposição ao chumbo, e assim permitir a avaliação de sua distribuição e padrão migratório.

Foram avaliados os rombômeros 1 a 7 (r1-7), nos estádios embrionários 8HH (26-29 horas) a 18HH (65-69 horas) de embriões pertencentes ao grupo controle e exposto ao chumbo. No estágio 8HH, tanto para o controle quanto exposto, se observa o tubo neural se fechando na altura do r1 ao r4 (Figura 26A-H), sendo que a partir de r5 as dobras neurais ainda não se fusionaram (Figura 26I-L). Estas características são condizentes com o padrão normal de desenvolvimento para este estágio (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; BELLAIRS; OSMOND, 2014). Porém, se observa no TN dos embriões expostos uma alteração em sua forma, além da presença de uma massa celular mais espessa em seu ápice dorsal (Figura 26B, D, F e H). Como há poucas células da crista neural marcadas,

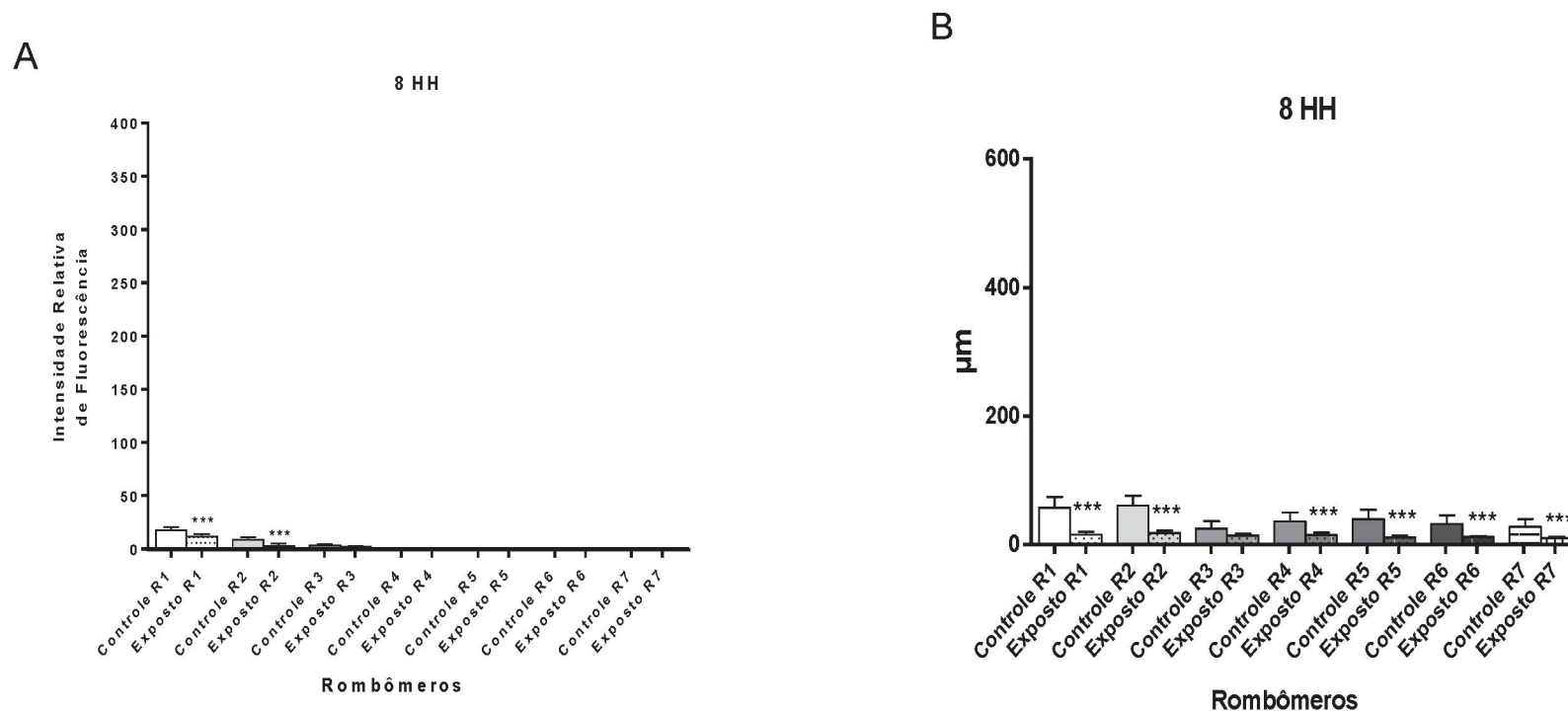


a intensidade de fluorescência neste estágio é bastante sutil (Figura 26M-N). Dentre todos os rombômeros observados, os r1 e r2 são os que apresentaram maior intensidade de fluorescência, apesar de nos expostos haver uma diminuição estatisticamente significativa quando comparados a seus controles. A partir do r3 a incidência de fluorescência é praticamente nula e não apresenta diferença significativa entre os dois grupos (Figura 27A). Neste estágio, poucas células da CN estão em migração, porém se observa que as células HNK-1+ do grupo controle se encontram mais distantes do tubo neural em relação às observadas no grupo exposto (Figura 27B). O r3 foi o único que não apresentou diferença significativa entre os grupos.

FIGURA 26 – CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus* NO ESTÁDIO 8HH

Cortes histológicos imunomarcados para identificação de anti-HNK-1 (vermelho) e DAPI (azul) submetidos a técnica *free floating*. C.r representa embrião controle seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. E.r representa embrião exposto ao Pb seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. TN: Tubo neural. F: Faringe. N: Notocorda. \*: Extremidade anterior da notocorda. Cabeça de seta: Ponto de fusão de dobras neurais. Seta larga: Dobras neurais não fusionadas. Estrela: Massa celular na extremidade do tubo neural. Seta: Células positivas para HNK-1. A-L: Barra = 100  $\mu$ m. M-N: Barra = 50  $\mu$ m. FONTE: A autora (2018).

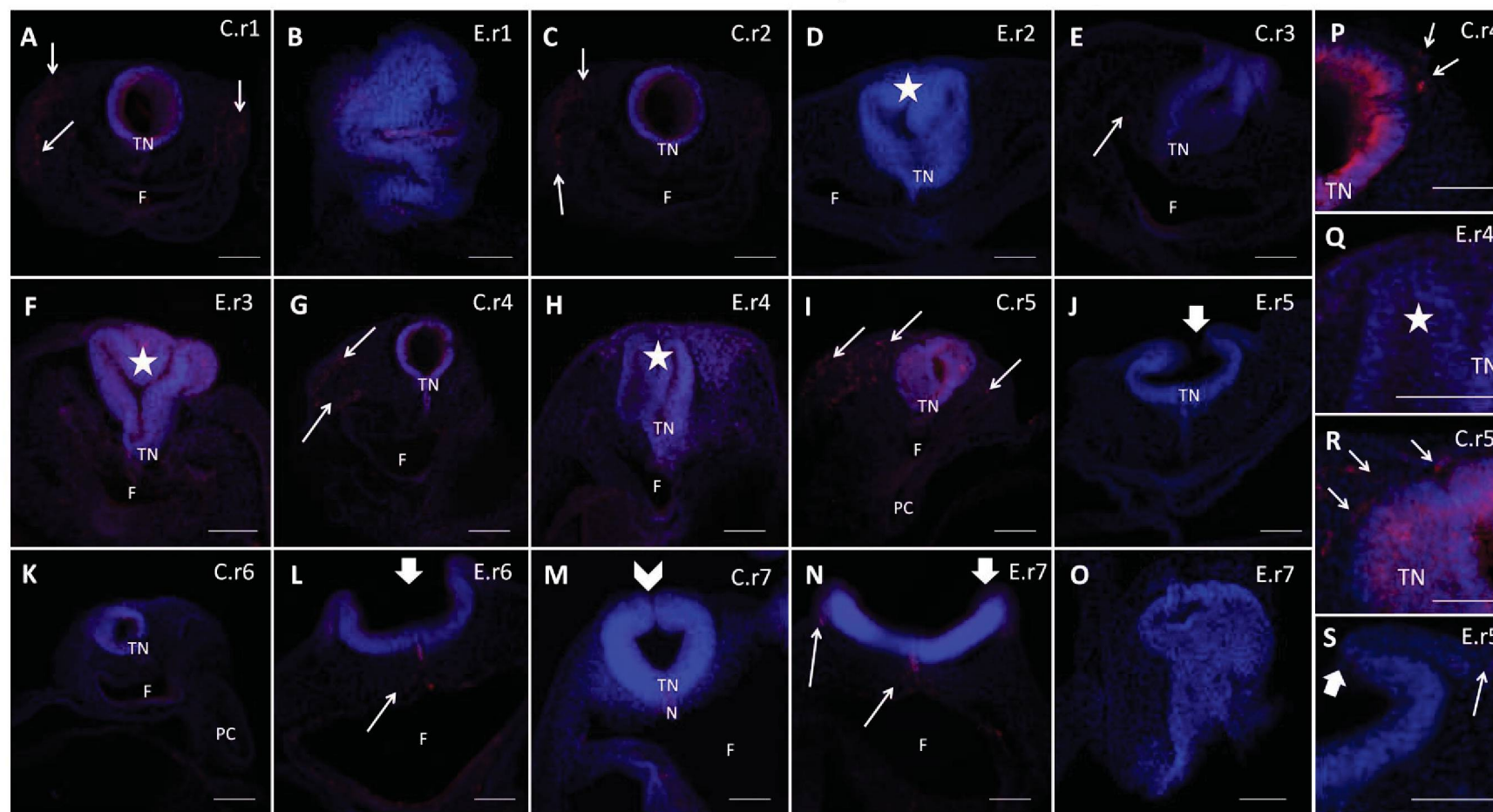
FIGURA 27 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 8 HH, POR ROMBÔMERO



ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Média e erro padrão. A: Intensidade relativa de Fluorescência. B: Distância linear das células da crista neural cefálica. Controle  $n = 2$ . Exposto  $n = 2$ . FONTE: A autora (2018).

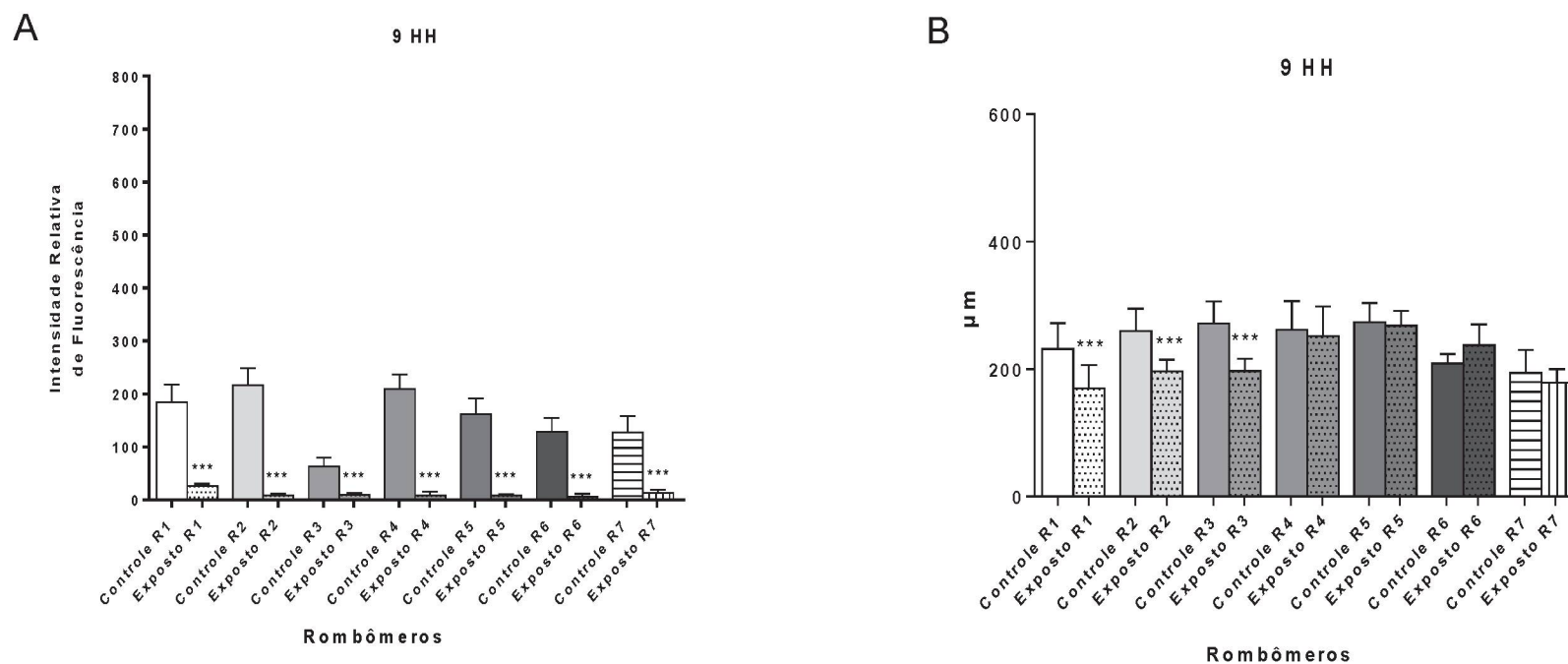
No estágio 9HH o padrão morfológico no grupo controle mostra-se normal, sendo observados TN totalmente fechado na região cefálica, presença da faringe e em r5 e r6 já se nota o primórdio cardíaco (Figura 28A, C, E, G, I, K e M). Nos expostos, o TN se encontrava fechado somente até o nível do r4, sendo observada uma massa celular mais espessa em todo seu diâmetro, além de alterações na sua forma e luz (Figura 28D, F, H). Essa massa celular não foi visualizada no TN que ainda não estava totalmente fechado (Figura 28J, L e N). Em um dos embriões expostos avaliados no nível de r1 e r7 não foi possível realizar a distinção das estruturas do tecido, como TN, notocorda e faringe (Figura 28B e O) pois se encontravam totalmente alterados. No grupo controle as células HNK-1 positivas eram melhor visualizadas (Figura 28P e R) quando comparadas às do grupo exposto (Figura 28Q e S). De um modo geral, os embriões controle obtiveram, em comparação ao estágio anterior, aumento na incidência de fluorescência em todos os rombômeros, o que é condizente com a progressão no desenvolvimento normal, o que é esperado. Nos embriões expostos também ocorreu o aumento da fluorescência, no entanto esse é estatisticamente menor do que no controle (Figura 29A). A distância das células positivas para HNK-1 em relação ao ápice do tubo neural também apresenta diferença significativa entre controle e exposto somente em r1, r2 e r3 (Figura 29B), sendo esta distância superior a apresentada no estágio anterior, indicando a progressão na migração desse grupo de células.



FIGURA 28 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus* NO ESTÁDIO 9HH

Cortes histológicos imunomarcados para identificação de anti-HNK-1 (vermelho) e DAPI (azul) submetidos a técnica *free floating*. C.r representa embrião controle seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. E.r representa embrião exposto ao Pb seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. TN: Tubo neural. F: Faringe. N: Notocorda. PC: Primórdio cardíaco. Cabeça de seta: Ponto de fusão das dobras neurais. Seta larga: Dobras neurais não fusionadas. Estrela: Massa celular na extremidade do tubo neural. Seta: Células positivas para HNK-1. A-O: Barra = 100  $\mu$ m. P-S: Barra = 50  $\mu$ m. FONTE: A autora (2018).

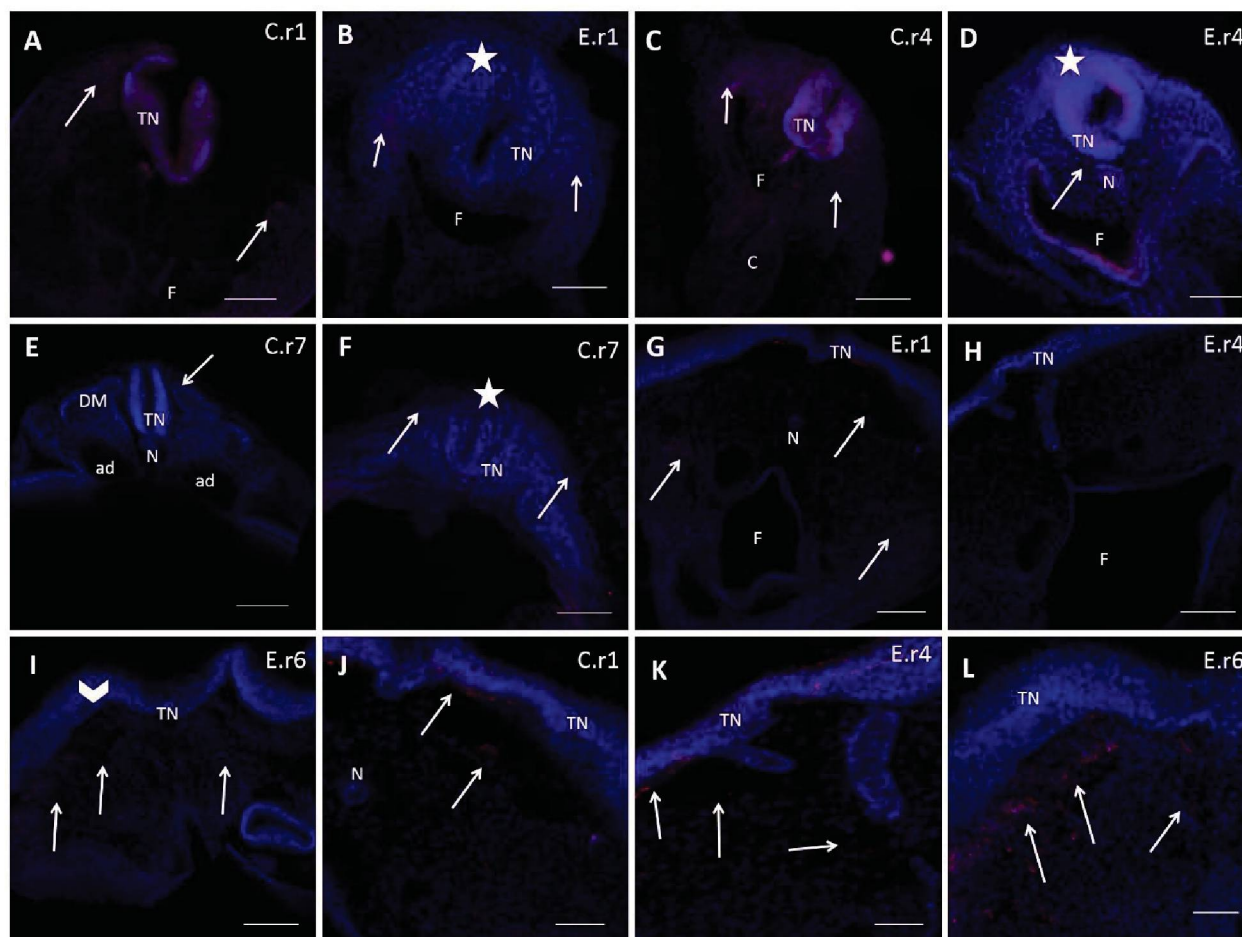
FIGURA 29 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 9 HH, POR ROMBÔMERO



ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Média e erro padrão. A: Intensidade relativa de Fluorescência. B: Distância linear das células da crista neural cefálica. Controle  $n = 2$ . Exposto  $n = 2$ . FONTE: A autora (2018).

Nos embriões controle, no estágio 10HH, o TN se encontra fechado em todos os níveis analisados, o coração está formado e no r7 já se observa o dermatomiótomo (Figura 30A, C e E). No caso do embrião exposto, normalmente o tubo neural se encontrava fechado e ainda com a massa celular espessa como no estágio anterior (Figura 30B, D e F). Somente um embrião exposto permaneceu com o TN aberto em toda extensão cefálica, porém notam-se células HNK-1+ no mesênquima abaixo do TN (Figura 30G-L). Este embrião não foi incluído na análise da distância linear de migração pois não se tinha parâmetro de medida. A intensidade de fluorescência nos controles deste estágio sempre foi estatisticamente maior do que nos expostos (Figura 31A). A distância linear de migração em r1, r2, r3, r6 e r7, no grupo exposto, apresenta-se significativamente inferior ao controle. Nos rombômeros 4 e 5 essa diferença não é observada, no entanto em r4 as células do grupo exposto estão migrando a uma maior distância do que as do grupo controle (Figura 31B).

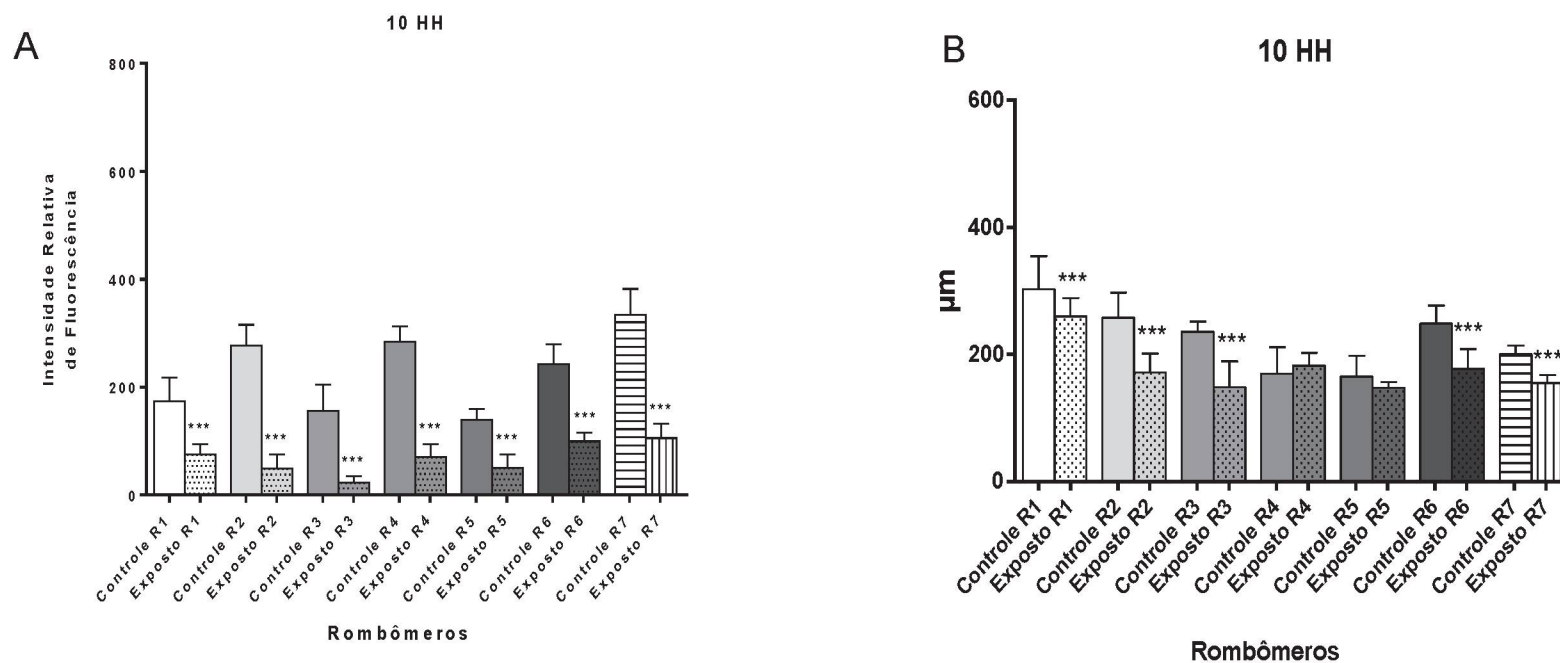
FIGURA 30 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus* NO ESTÁDIO 10HH



Cortes histológicos imunomarcados para identificação de anti-HNK-1 (vermelho) e DAPI (azul) submetidos a técnica *free floating*. C.r representa embrião controle seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. E.r representa embrião exposto ao Pb seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. TN: Tubo neural. F: Faringe. N: Notocorda. C: Coração. DM: Dermatomioto. Estrela: Massa celular na extremidade do tubo neural. Seta: Células positivas para HNK-1. A-H: Barra = 100  $\mu$ m. I-L: Barra = 50  $\mu$ m. FONTE: A autora (2018).



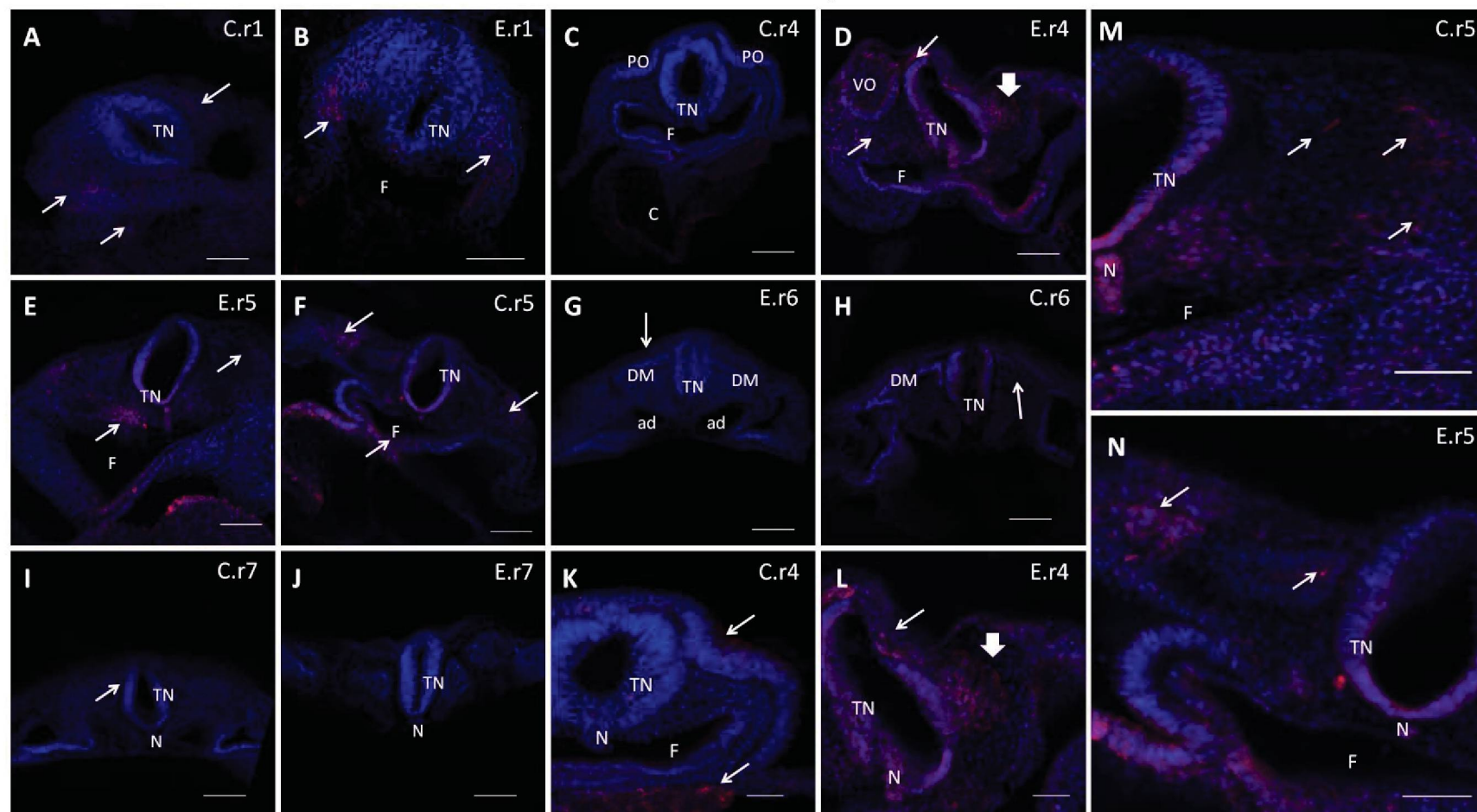
FIGURA 31 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 10 HH, POR ROMBÔMERO



ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Média e erro padrão. A: Intensidade relativa de Fluorescência. B: Distância linear das células da crista neural cefálica. Controle  $n = 2$ . Exposto  $n = 3$ . FONTE: A autora (2018).

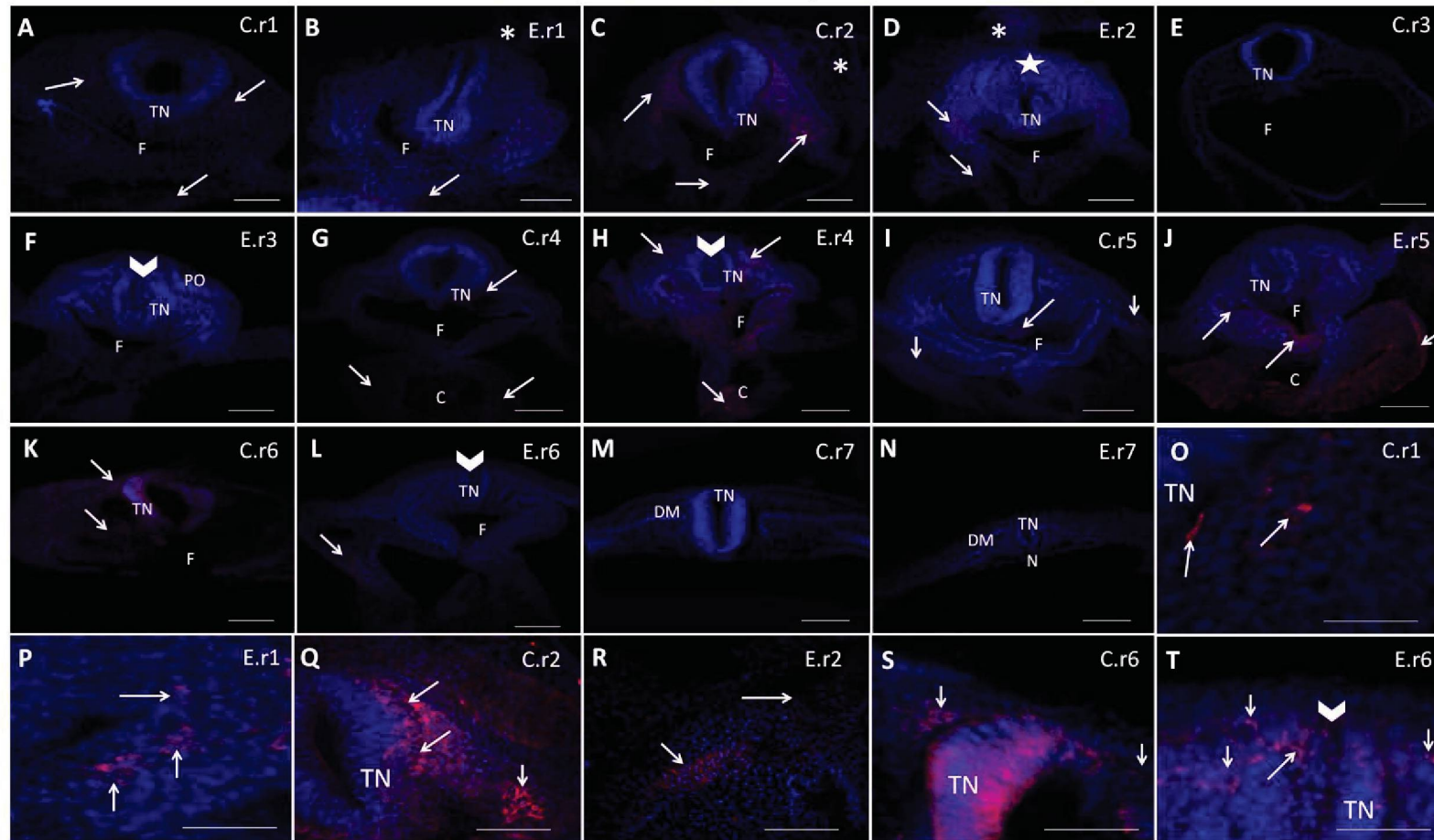
Nos estádios 11 e 12HH as características morfológicas no embrião controle continuam dentro da normalidade, sendo encontrado TN fechado, coração, faringe, dermatomiótomo e placóides ópticos presentes (Figura 32A, C, F, H, I, K e M e Figura 33A, C, E, G, I, K, M, O, Q e S, respectivamente). São observadas células marcadas amplamente distribuídas. Nos grupos expostos, assim como ocorreu nos anteriores, o padrão morfológico se encontrava anormal (Figura 32B, D, E, G, J, L e N e Figura 33B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, respectivamente), apresentando TN com forma e diâmetro alterados, e grupamentos celulares na luz do TN, sendo algumas HNK-1 positivas. Como observamos também em embrião de 3 dias de incubação, através da autometalografia, um aglomerado de células positivas para deposição de chumbo na luz do TN, no rombômero 6 (Figura 21), realizamos um ensaio de imunomarcação com anti-HNK-1 por peroxidase, na lâmina correspondente ao corte da figura 21 (lâmina em duplicata), para confirmação de que os acúmulos celulares presentes na luz do TN e que apresentavam deposição de chumbo eram compostos por células da crista neural. No Apêndice 1 se observa, nas duas metodologias, marcação positiva para presença de Pb (Apêndice 1A-B) em algumas células positivas para HNK-1 (Apêndice 1C-D). A intensidade de fluorescência e distância linear de migração no estágio 11HH é maior do que no estágio 10HH, progredindo com o desenvolvimento. A fluorescência é mais acentuada no controle, sendo estatisticamente diferente em todos os níveis axiais analisados (Figura 34A). Enquanto a distância de migração diminuiu significativamente em r2, r4 e r7, nos rombômeros 1, 3, 5 e 6 não foi observada essa diferença, porém, assim como ocorreu em r4 do estágio 10HH, em r5 e r6 as células do grupo exposto estão migrando a uma distância maior do que as observadas no grupo controle (Figura 34B). No entanto, no estágio 12HH ocorre uma diminuição da fluorescência, tanto no controle quanto no exposto, quando comparado ao estágio 11HH, sendo que o grupo controle era significativamente maior do que o exposto, em todos os rombômeros (Figura 35A). Entretanto, a distância de migração foi significativamente menor no controle apenas em r3 e maior ao nível de r2 e r4 (Figura 35B).

FIGURA 32 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus* NO ESTÁDIO 11HH



Cortes histológicos imunomarcados para identificação de anti-HNK-1 (vermelho) e DAPI (azul) submetidos a técnica *free floating*. C.r representa embrião controle seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. E.r representa embrião exposto ao Pb seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. TN: Tubo neural. F: Faringe. N: Notocorda. C: Coração. PO: Placóide ótico (Lugar de destino ótico). VO: Vesícula ótica. Seta: Células positivas para HNK-1. Seta larga: Células HNK-1+ reunindo-se para formar gânglios. A-J: Barra = 100  $\mu$ m. K-N: Barra = 50  $\mu$ m. FONTE: A autora (2018).

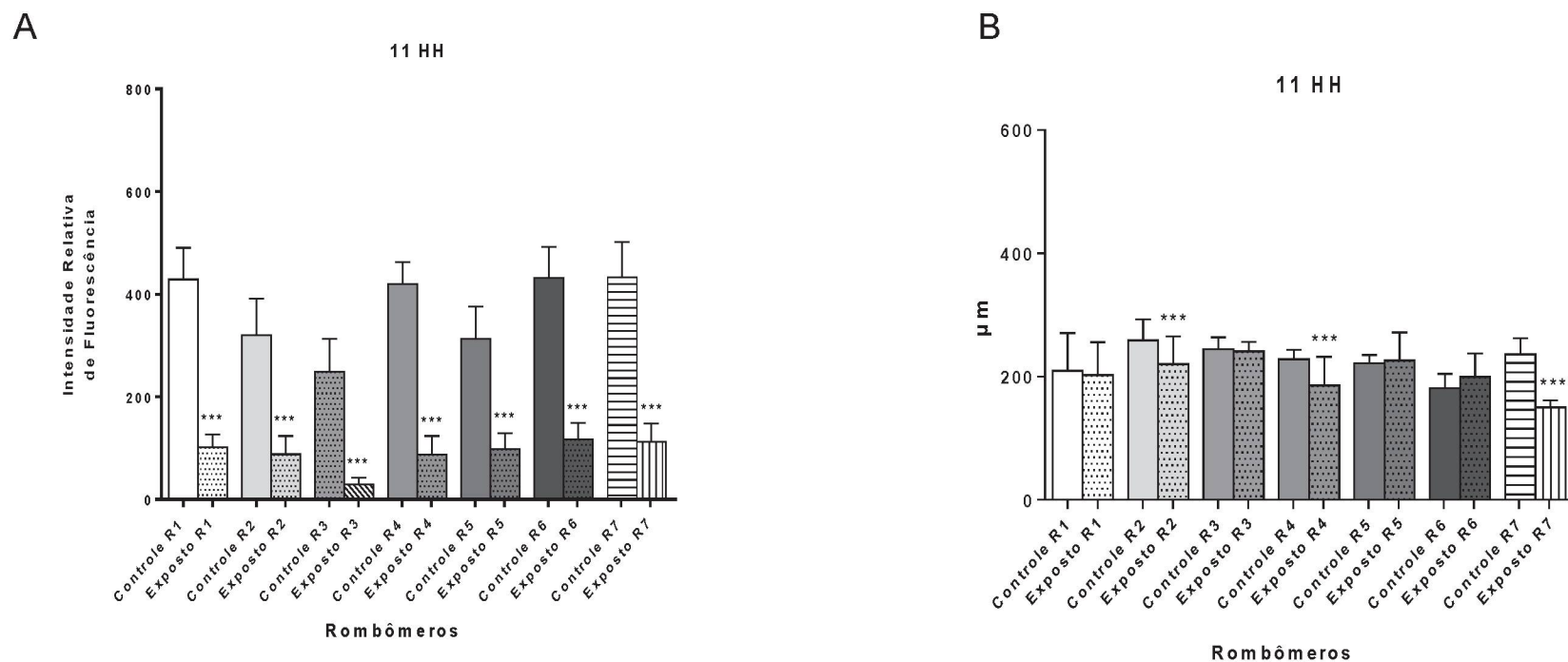


FIGURA 33 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus* NO ESTÁDIO 12HH

Cortes histológicos imunomarcados para identificação de anti-HNK-1 (vermelho) e DAPI (azul) submetidos a técnica *free floating*. C.r representa embrião controle seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. E.r representa embrião exposto ao Pb seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. TN: Tubo neural. F: Faringe. N: Notocorda. C: Coração. PO: Placóide ótico (Lugar de destino ótico). DM: Dermatomiótomo. Cabeça de seta: Células ocupando o tubo neural. Estrela: Massa celular na extremidade do tubo neural. Seta: Células positivas para HNK-1. \*: Membranas extra-embriônicas A-P: Barra = 100  $\mu$ m. Q-T: Barra = 50  $\mu$ m. FONTE: A autora (2018).

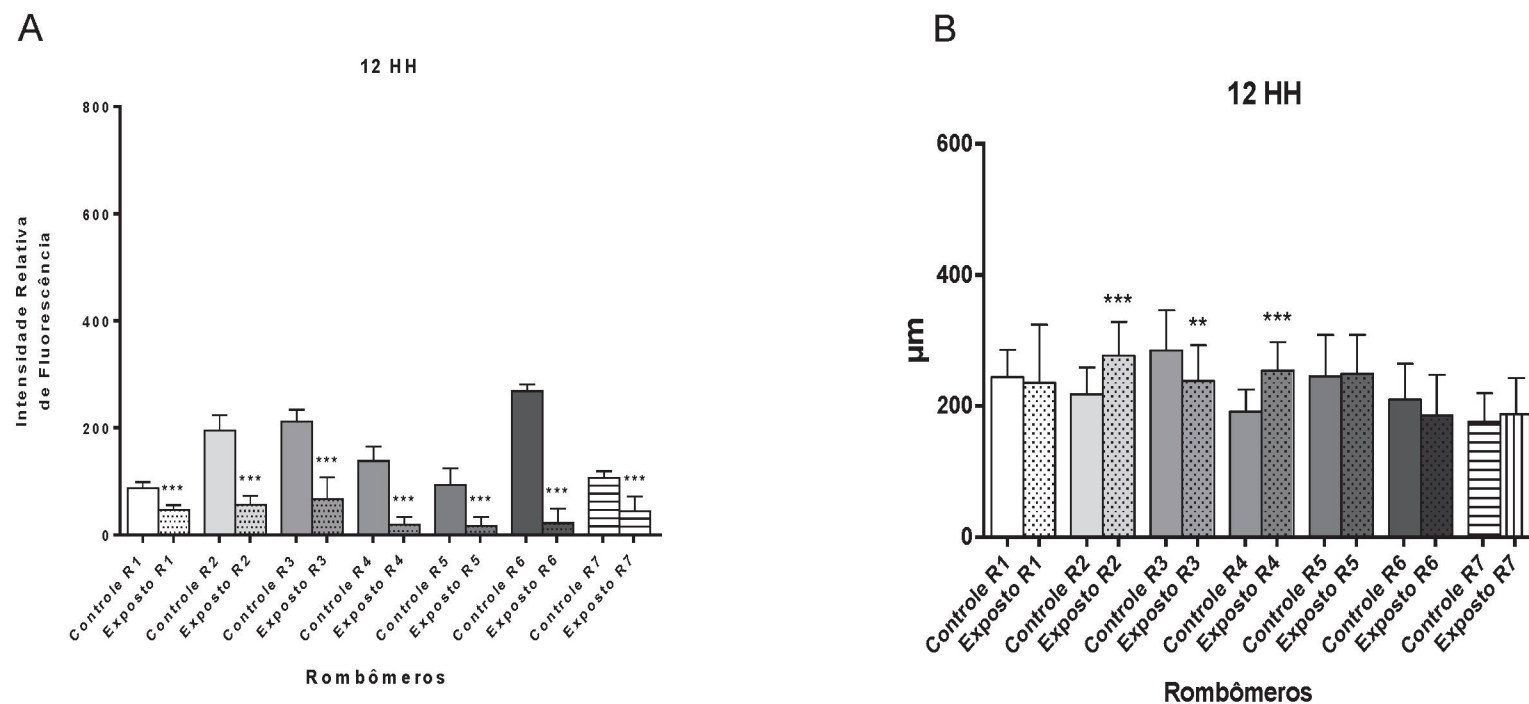


FIGURA 34 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 11 HH, POR ROMBÔMERO



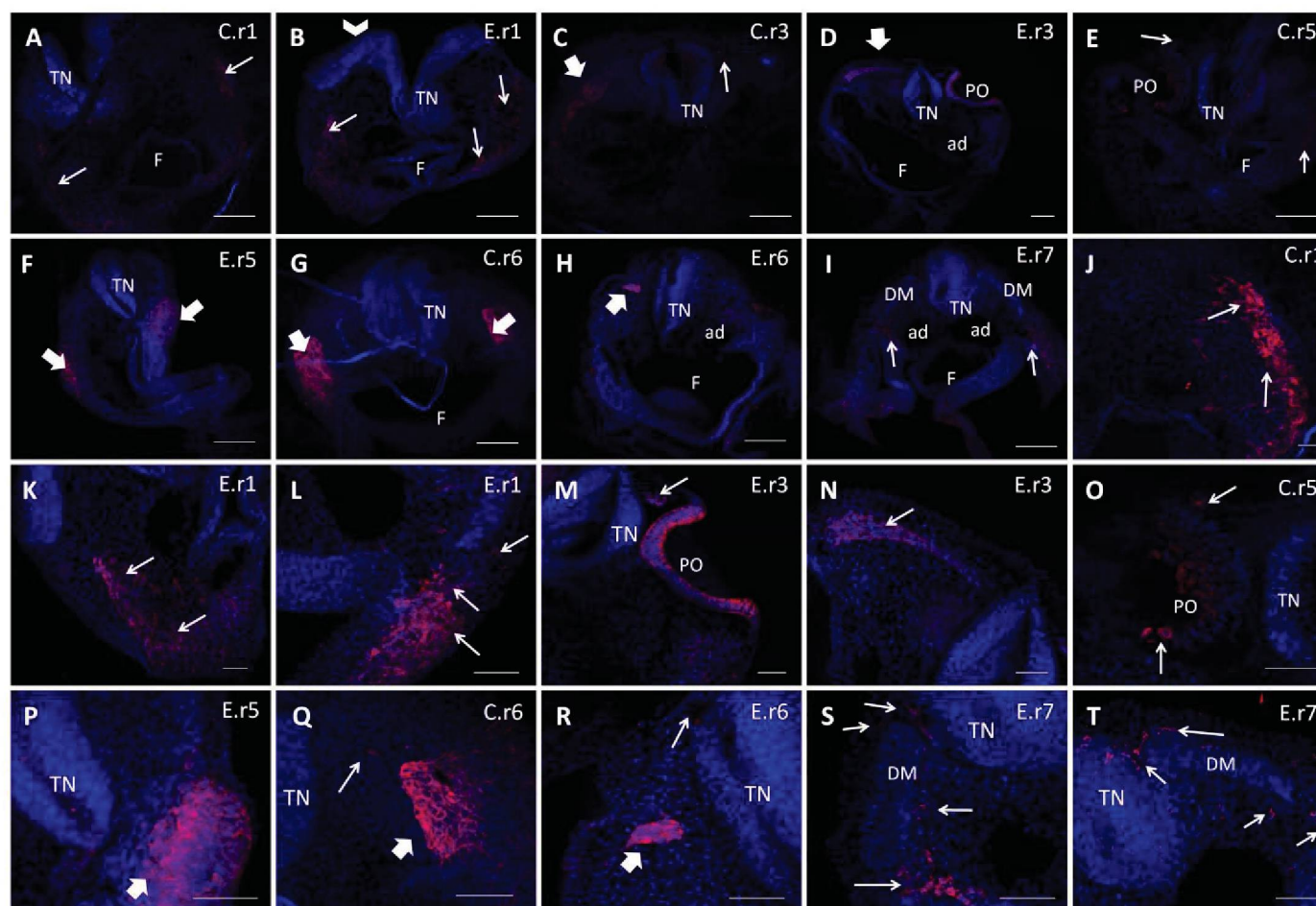
ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Média e erro padrão. A: Intensidade relativa de Fluorescência. B: Distância linear das células da crista neural cefálica. Controle  $n = 2$ . Exposto  $n = 2$ . FONTE: A autora (2018).

FIGURA 35 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 12 HH, POR ROMBÔMERO



ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Média e erro padrão. A: Intensidade relativa de Fluorescência. B: Distância linear das células da crista neural cefálica. Controle  $n = 2$ . Exposto  $n = 3$ . FONTE: A autora (2018).

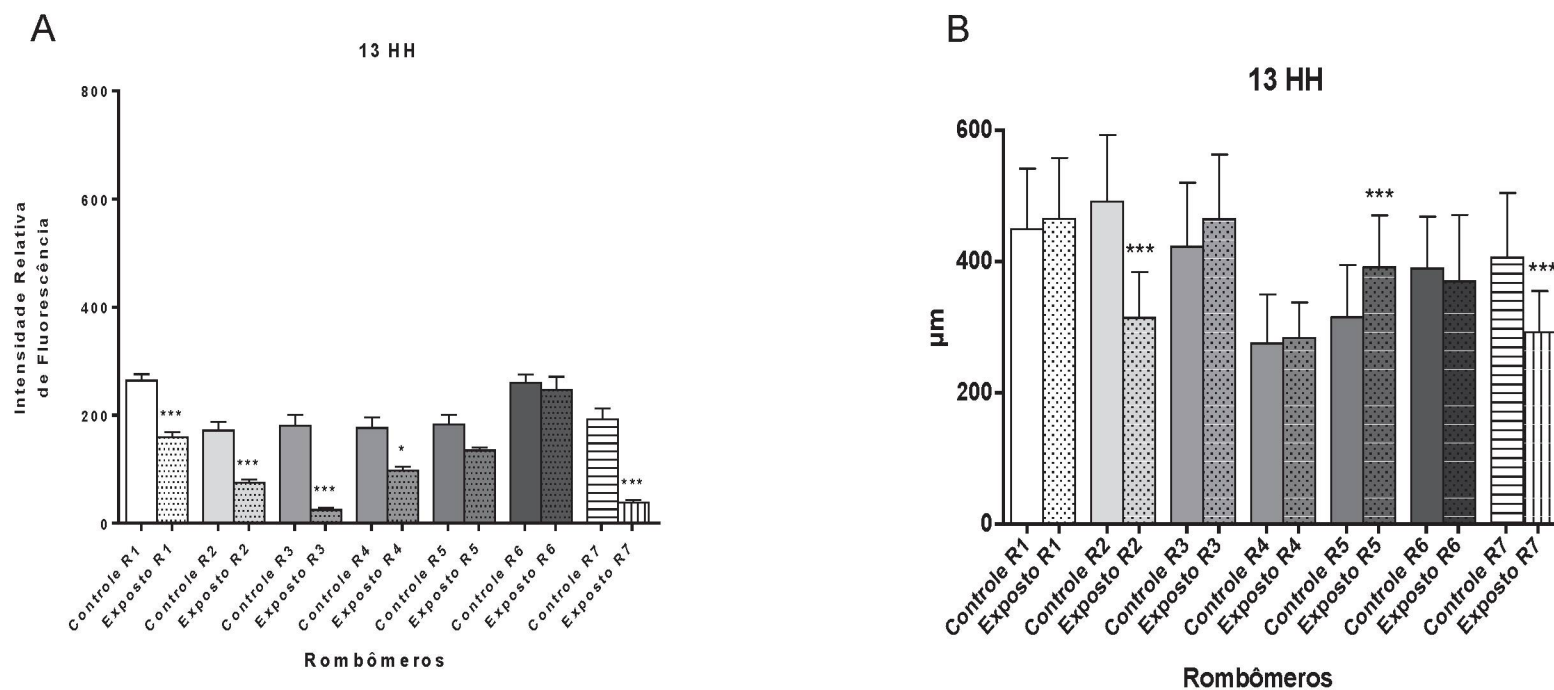
Em 13HH as características morfológicas no embrião controle mostram-se dentro do padrão normal, pois o tubo neural se encontra fechado em toda sua extensão, são observados faringe, dermatomiótomo, placóides ópticos e grupamentos compostos por células da crista neural que irão formar os gânglios cranianos (Figura 36A, C, E, G, J, O e P). No embrião exposto, também são observadas as estruturas descritas anteriormente (Figura 36B, D, F,H, I, K, M, N, P, R-T), porém ao nível de r1, o tubo neural está aberto (Figura 36B), os grupamentos celulares (futuros gânglios cranianos) aparecem com tamanho diminuído no rombômero 6 (Figura 36H) e ao nível de r7 as células da CN estão migrando ventralmente ao dermatomiótomo (Figura 36S-T). Neste estágio a intensidade de fluorescência é significativamente maior no embrião controle, em quase todos os rombômeros analisados, com exceção do 5° e 6° (Figura 37A). Nessa etapa do desenvolvimento a distância de migração em r1, r3, r4 e r6 não demonstra diferença significativa. Nos rombômeros 2 e 7 a migração é significativamente maior no grupo controle, porém em r5 é significativamente menor (Figura 37B).

FIGURA 36 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus* NO ESTÁDIO 13HH

Cortes histológicos imunomarcados para identificação de anti-HNK-1 (vermelho) e DAPI (azul) submetidos a técnica *free floating*. C.r representa embrião controle seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. E.r representa embrião exposto ao Pb seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. TN: Tubo neural. F: Faringe. ad: Aorta dorsal. PO: Placóide ótico (Lugar de destino ótico). DM: Dermatomiótomo. Cabeça de seta: Tubo neural aberto. Seta: Células positivas para HNK-1. Seta larga: Grupamentos de células HNK-1+ precursoras dos gânglios. A-I: Barra = 100  $\mu$ m. J-T: Barra = 50  $\mu$ m. FONTE: A autora (2018).

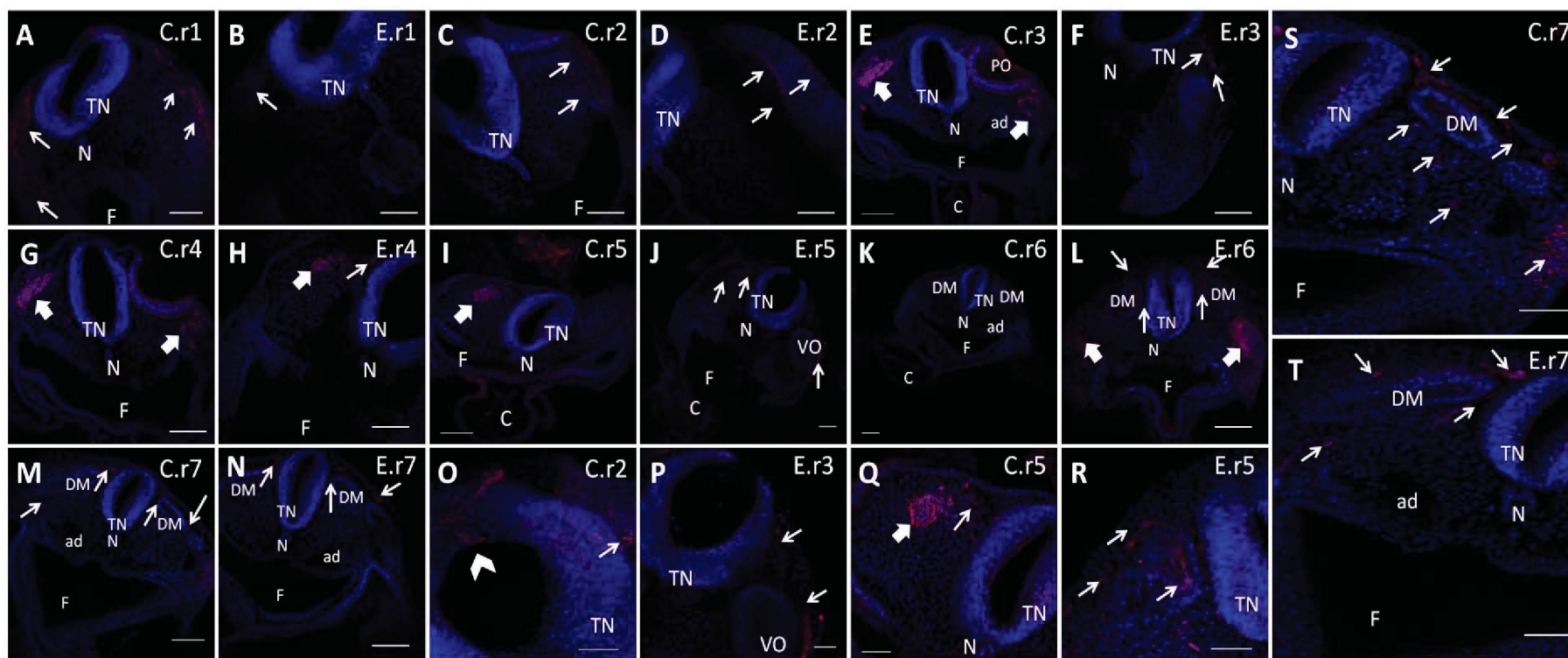


FIGURA 37 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 13 HH, POR ROMBÔMERO



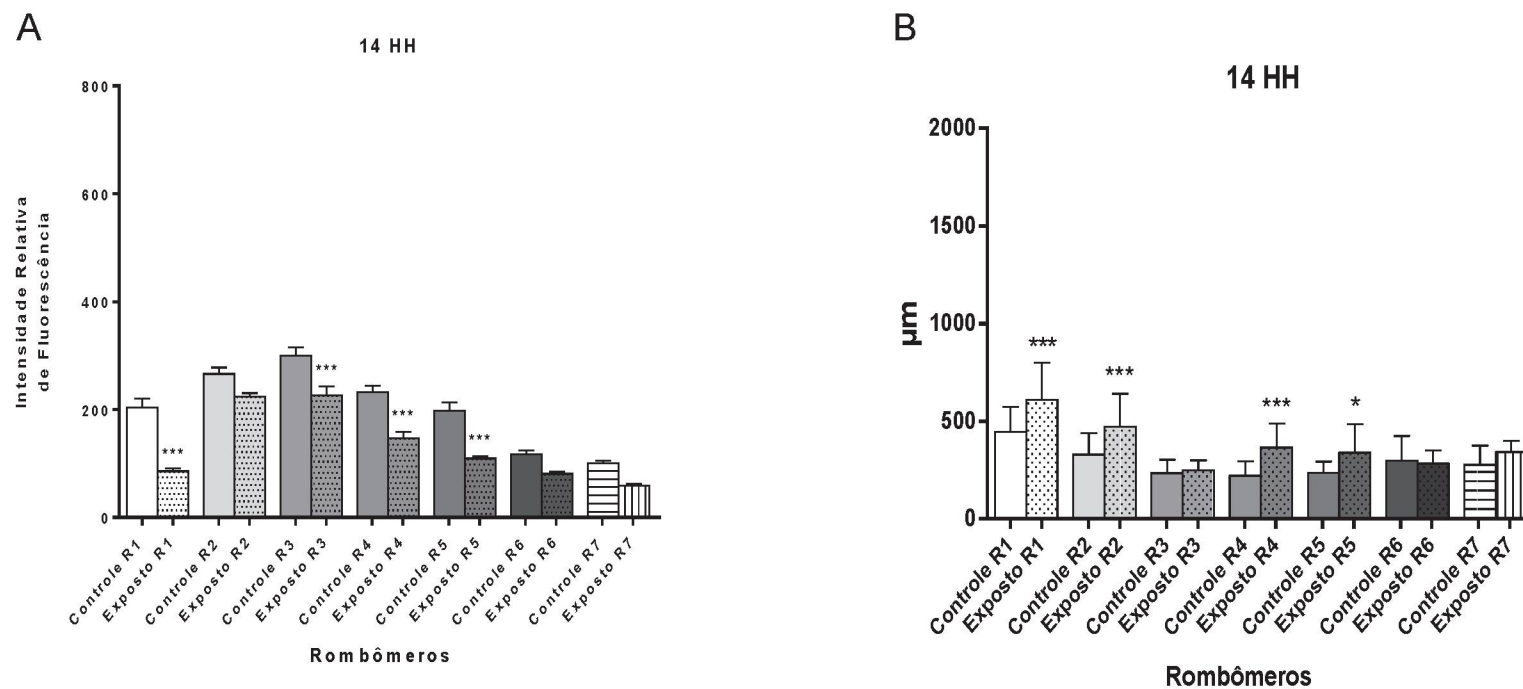
ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Média e erro padrão. A: Intensidade relativa de Fluorescência. B: Distância linear das células da crista neural cefálica. Controle  $n = 2$ . Exposto  $n = 3$ . FONTE: A autora (2018).

No estágio 14HH, no embrião controle, a morfologia condiz com a descrição normal para esta fase do desenvolvimento, notando-se tubo neural fechado em toda extensão do embrião, faringe, coração, vesícula óptica, gânglios cranianos, e dermatomiótomo (Figura 38A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S). Nesta fase praticamente não se observaram diferenças morfológicas entre controle e exposto ao Pb (Figura 38B, D, F, H, J, L, N, P, R e T). No entanto, as células da CN, no controle, migram através da via dorsolateral pelo mesênquima superior ao dermatomiótomo (Figura 38S). Já no exposto, a migração ocorre também através da via ventral (Figura 38T). A intensidade de fluorescência apresenta-se significativamente reduzida no grupo exposto, nos rombômeros 1,3,4 e 5 (Figura 39A). A migração das células da CN está aumentada no grupo exposto, em quase todos os rombômeros, exceto em r6. Essa diferença é estatisticamente significativa em r1, r2 e r4 e em menor proporção em r5 (Figura 39B).

FIGURA 38 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus* NO ESTÁDIO 14HH

Cortes histológicos imunomarcados para identificação de anti-HNK-1 (vermelho) e DAPI (azul) submetidos a técnica *free floating*. C.r representa embrião controle seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. E.r representa embrião exposto ao Pb seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. TN: Tubo neural. N: Notocorda. F: Faringe. C: Coração. ad: Aorta dorsal. PO: Placóide ótico (Lugar de destino ótico). VO: vesícula óptica. DM: Dermatomiótomo. Cabeça de seta: Células HNK-1+ delaminando do tubo neural. Seta: Células positivas para HNK-1. Seta larga: Gânglios formados por células HNK-1+. A-N: Barra = 100  $\mu$ m. O-T: Barra = 50  $\mu$ m. FONTE: A autora (2018).

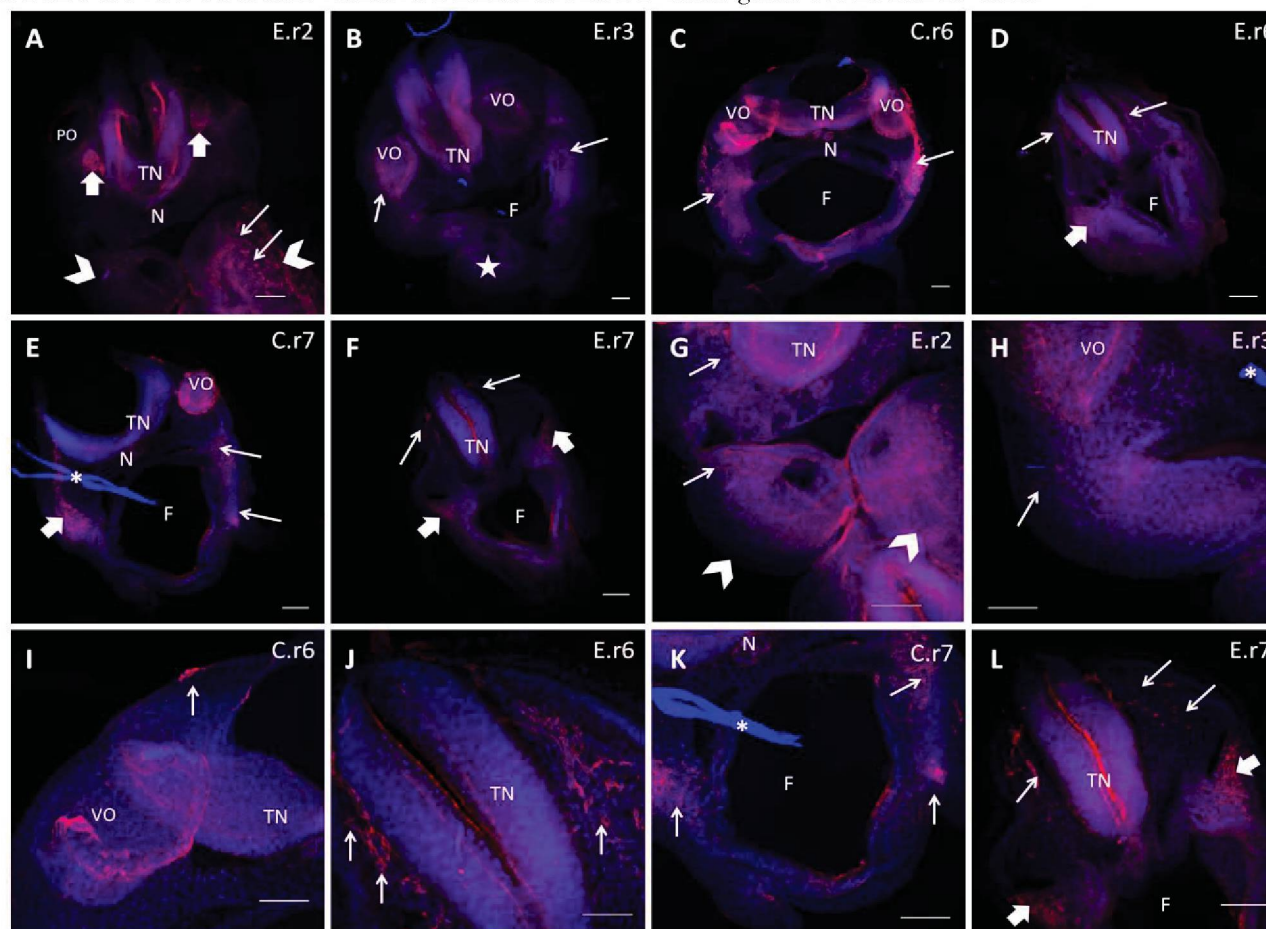
FIGURA 39 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 14 HH, POR ROMBÔMERO



ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Média e erro padrão. A: Intensidade relativa de Fluorescência. B: Distância linear das células da crista neural cefálica. Controle  $n = 3$ . Exposto  $n = 2$ . FONTE: A autora (2018).

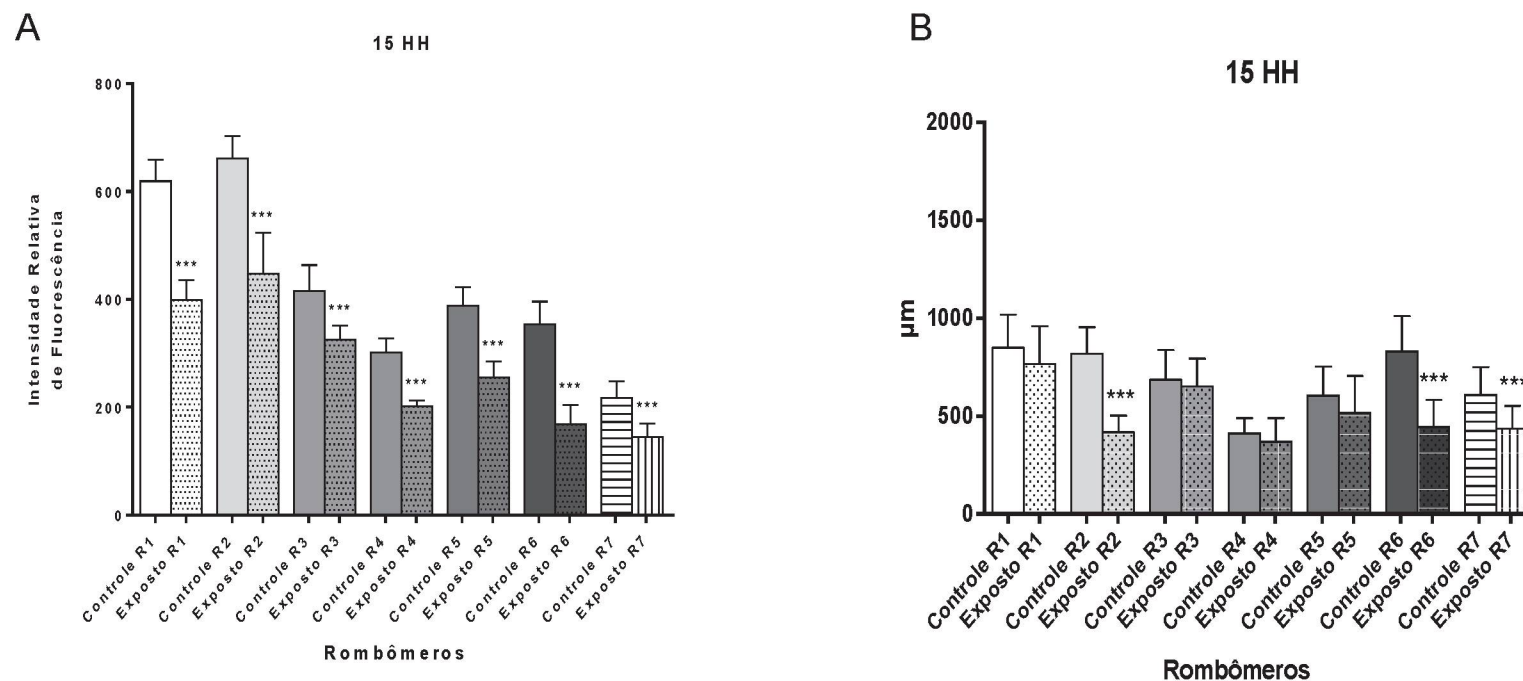


A morfologia dos embriões, controle e exposto, no estágio 15HH mostra-se normal (Figura 40A-L). A diferença observada entre os grupos está relacionada à diferença na intensidade de fluorescência e à distância de migração das células da CN. Nota-se um aumento significativo da fluorescência no grupo controle (Figura 41A) e uma redução significativa na distância de migração das células da CN em r2, r6 e r7 no grupo exposto (Figura 41B).

FIGURA 40 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus* NO ESTÁDIO 15HH

Cortes histológicos imunomarcados para identificação de anti-HNK-1 (vermelho) e DAPI (azul) submetidos a técnica *free floating*. C.r representa embrião controle seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. E.r representa embrião exposto ao Pb seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. TN: Tubo neural. N: Notocorda. F: Faringe. PO: Placóide ótico (Lugar de destino ótico). VO: vesícula óptica. Estrela: Porção superior arco branquial. Cabeça de seta: arcos branquiais. Seta: Células positivas para HNK-1. Seta larga: Gânglios formados por células HNK-1+. \*: Artefatos de preparação. A-F: Barra = 100  $\mu$ m. G-L: Barra = 50  $\mu$ m. FONTE: A autora (2018).

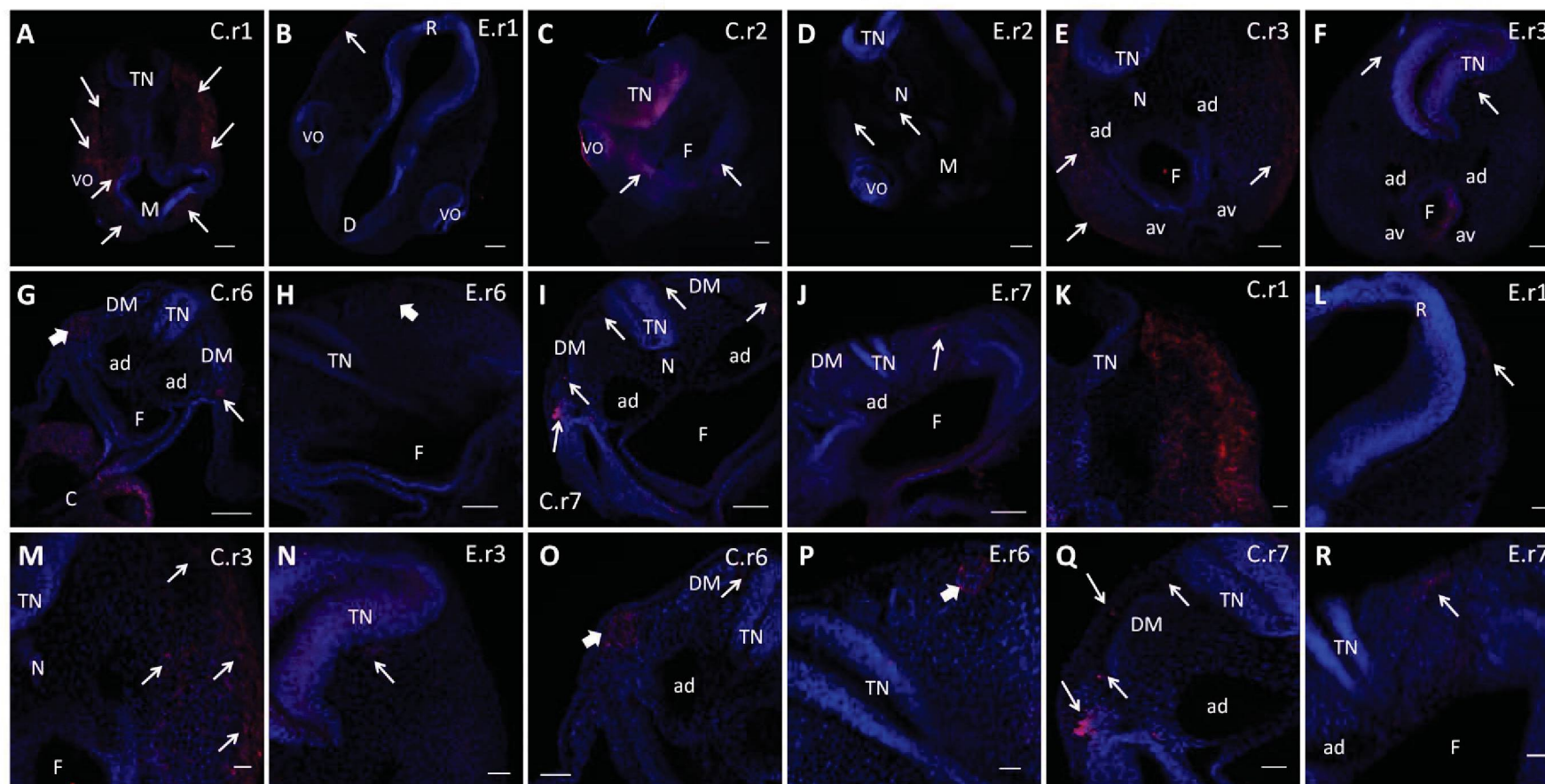
FIGURA 41 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 15 HH, POR ROMBÔMERO



ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Média e erro padrão. A: Intensidade relativa de Fluorescência. B: Distância linear das células da crista neural cefálica. Controle  $n = 3$ . Exposto  $n = 2$ . FONTE: A autora (2018).

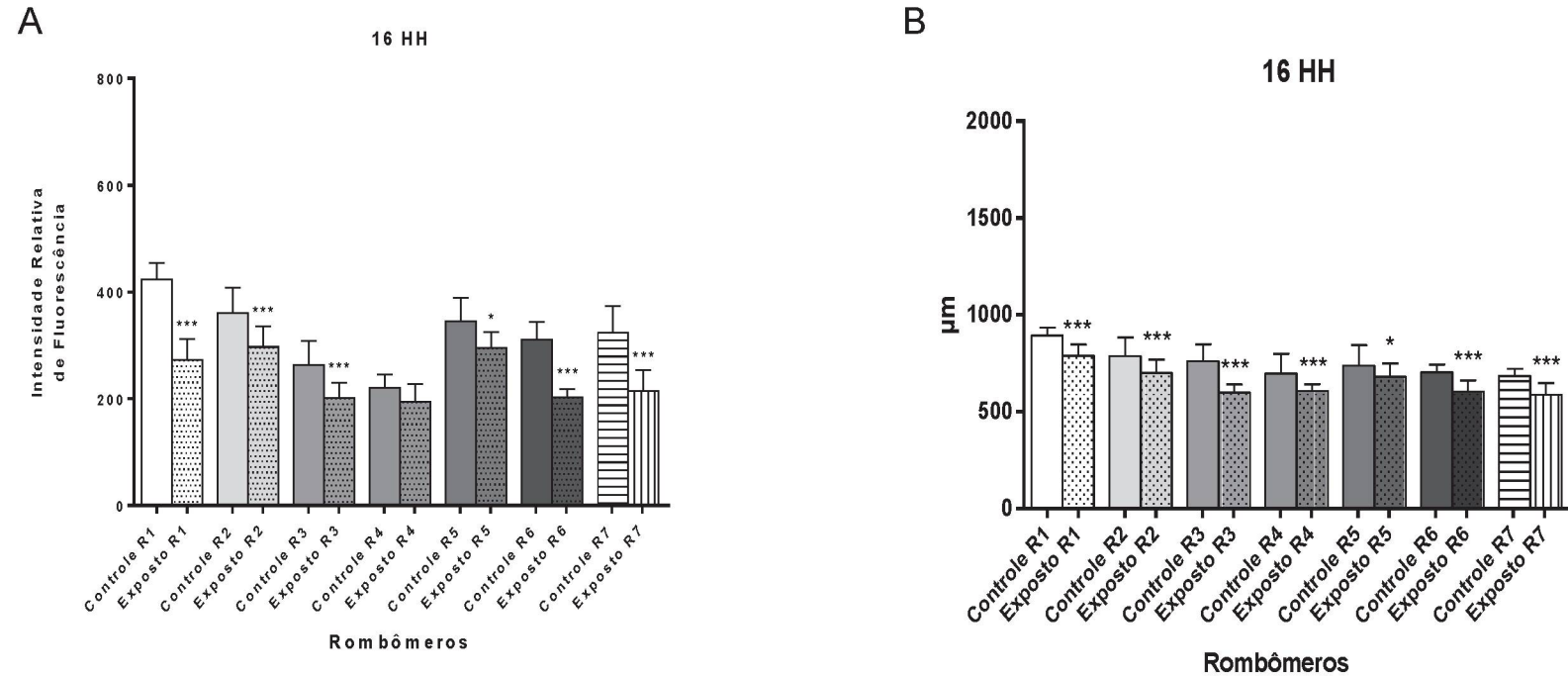
A partir do estágio 16HH, em alguns cortes, são observadas além do rombencéfalo, regiões cefálicas anteriores a ele, devido a curvatura do embrião e a incidência do corte. O controle mostra-se dentro do padrão normal, onde visualizamos o tubo neural fechado, faringe, coração vesículas ópticas, gânglios cranianos evidentes e dermatomiótomo (Figura 42A, C, E, G, I, K, M, O e Q). No embrião exposto não são observadas alterações na morfologia tão proeminentes (Figura 42B, D, F, H, J, L, N, P e R) quanto às indicadas em estádios anteriores. A forma do tubo neural esta alterada em r3 e os gânglios cranianos apresentam tamanho reduzido em comparação ao controle (Figura 42H). A intensidade relativa de fluorescência é significativamente diminuída nos embriões expostos, exceto ao nível de r4 onde esta diferença não é significativa (Figura 43A). Nesta fase do desenvolvimento as células da CN do grupo controle migraram para regiões significativamente mais distantes do tubo neural em todos os níveis axiais em comparação aos mesmos níveis no grupo exposto (Figura 43B).



FIGURA 42 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus* NO ESTÁDIO 16HH

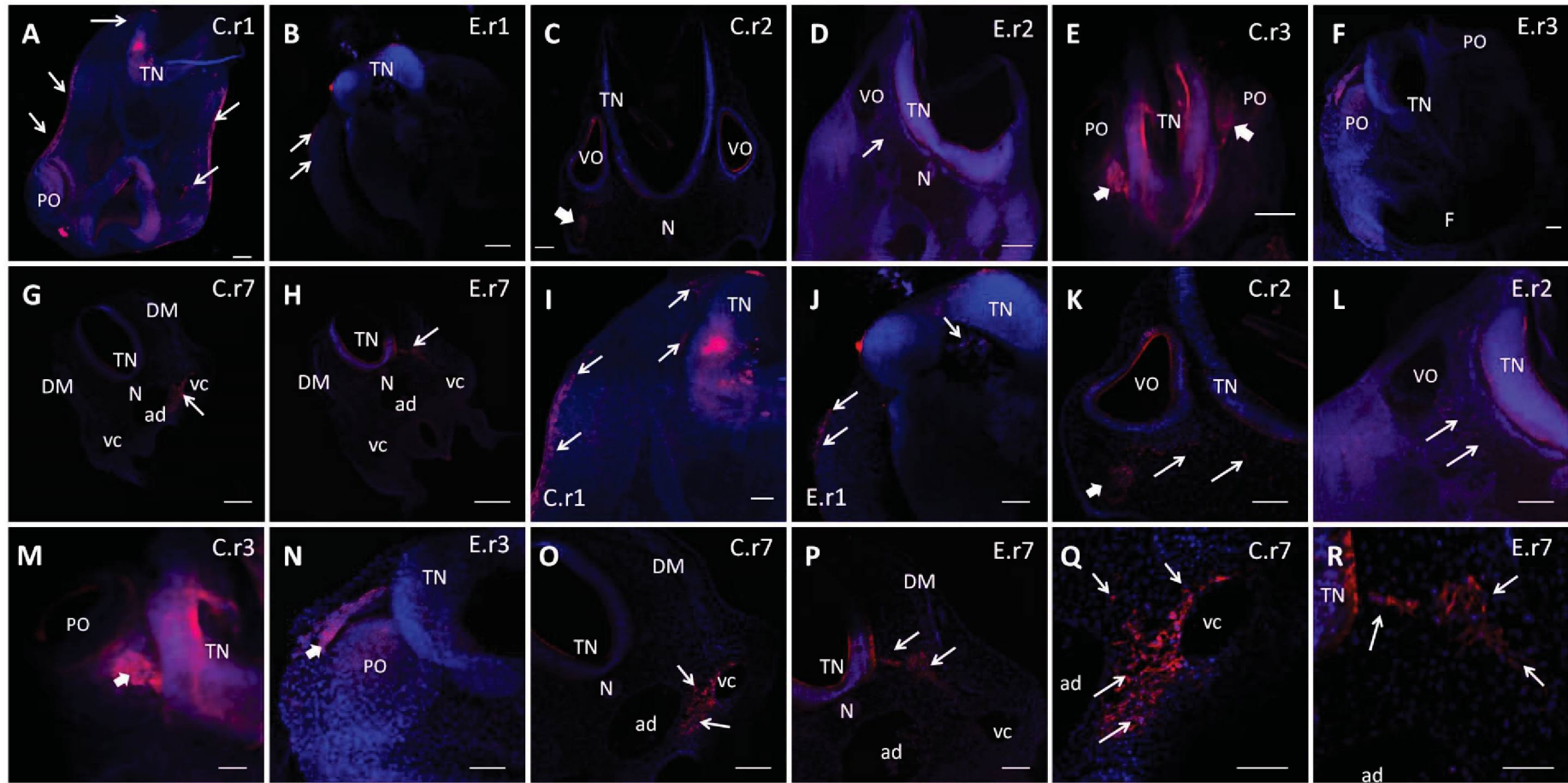
Cortes histológicos imunomarcados para identificação de anti-HNK-1 (vermelho) e DAPI (azul) submetidos a técnica *free floating*. C.r representa embrião controle seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. E.r representa embrião exposto ao Pb seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. TN: Tubo neural. N: Notocorda. F: Faringe. VO: vesícula óptica. C: Coração. ad: Aorta dorsal. av: Aorta ventral. DM: Dermatomiótomo. Seta: Células positivas para HNK-1. Seta larga: Gânglios formados por células HNK-1+. A-J: Barra = 100  $\mu$ m. K-R: Barra = 50  $\mu$ m. FONTE: A autora (2018).

FIGURA 43 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 16 HH, POR ROMBÔMERO



ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Média e erro padrão. A: Intensidade relativa de Fluorescência. B: Distância linear das células da crista neural cefálica. Controle  $n = 3$ . Exposto  $n = 2$ . FONTE: A autora (2018).

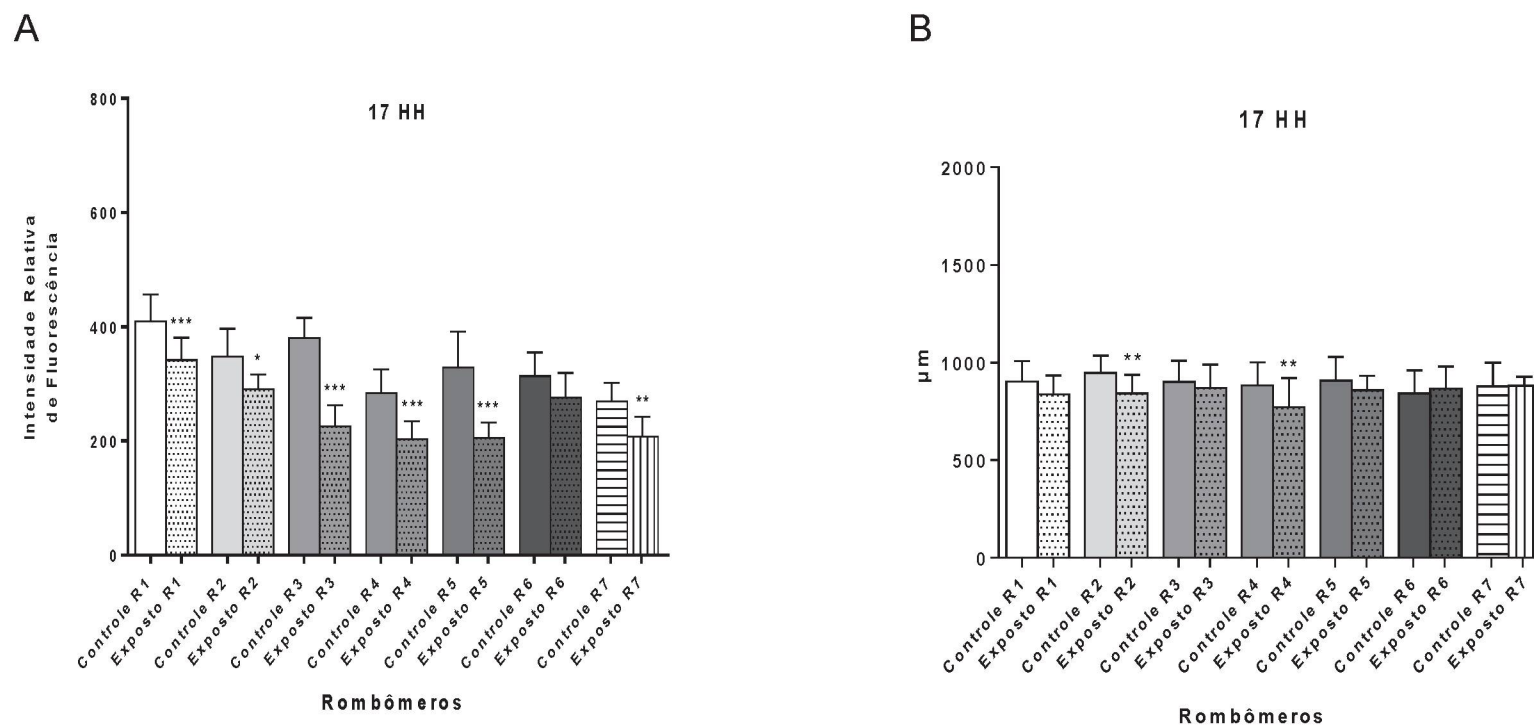
No estágio 17HH a morfologia do controle está normal (Figura 44A, E, G, I, K, M, O e Q), apesar de serem observadas alterações no ápice do TN em decorrência da técnica empregada (Figura 44C), o que também pode ser notado no exposto (Figura 44D). Morfologicamente, o grupo exposto não apresenta grandes diferenças quando comparado ao controle (Figura 44B, F, H, J, L, N, P e R). No entanto, são visualizadas, no controle em r7, células da CN próximas à veia cardinal anterior, diferente do exposto, onde as células encontram-se ainda delaminando do TN e próximas a ele (Figura 44Q e R, respectivamente). No embrião exposto o TN estava com formato alterado ao nível de r1 e os gânglios cranianos em r2, adjacentes à vesícula óptica, não estavam bem evidentes (Figura 44B e D, respectivamente). A intensidade de fluorescência está significativamente diminuída nos embriões expostos em quase todos os níveis analisados, exceto em r6 (Figura 45A). A distância de migração é significativamente maior no controle em r2 e r4 (Figura 45B).

FIGURA 44 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus* NO ESTÁDIO 17HH

Cortes histológicos imunomarcados para identificação de anti-HNK-1 (vermelho) e DAPI (azul) submetidos a técnica *free floating*. C.r representa embrião controle seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. E.r representa embrião exposto ao Pb seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. TN: Tubo neural. N: Notocorda. PO: Placóide ótico (Lugar de destino ótico). VO: vesícula óptica. ad: Aorta dorsal. vc: Veia cardinal anterior. Seta: Células positivas para HNK-1. Seta larga: Gânglios formados por células HNK-1+. A-H: Barra = 100  $\mu$ m. I-R: Barra = 50  $\mu$ m. FONTE: A autora (2018).

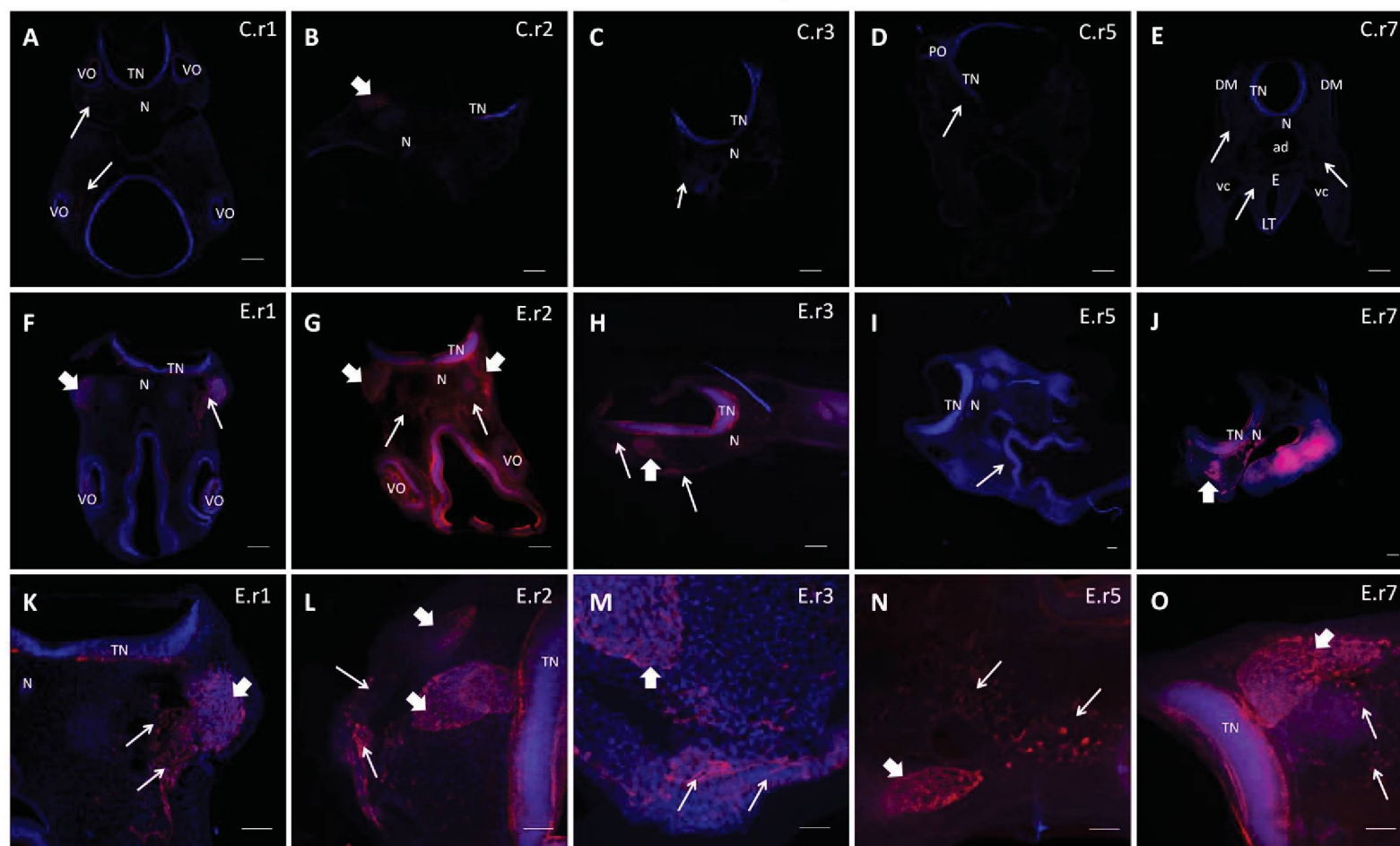


FIGURA 45 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 17 HH, POR ROMBÔMERO



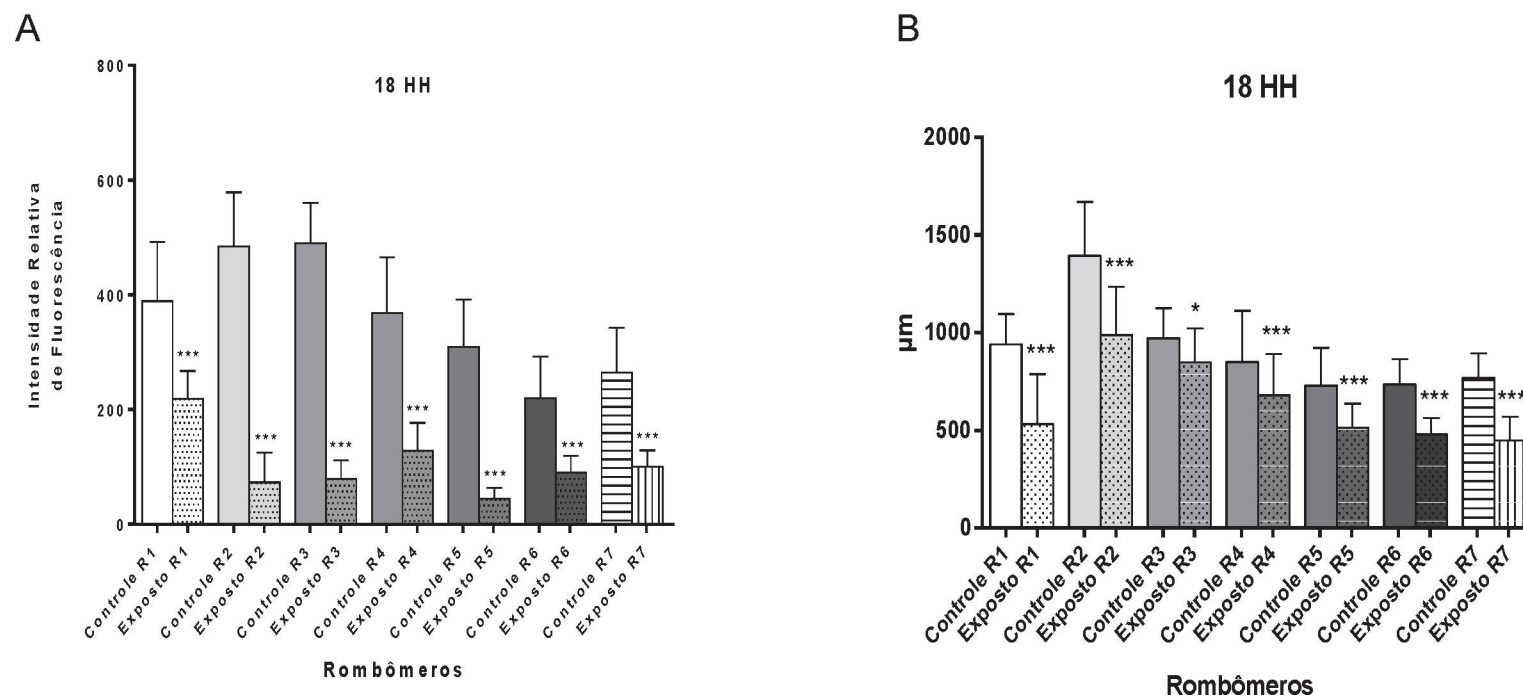
ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Média e erro padrão. A: Intensidade relativa de Fluorescência. B: Distância linear das células da crista neural cefálica. Controle  $n = 2$ . Exposto  $n = 2$ . FONTE: A autora (2018).

No estágio 18HH a morfologia dos embriões controle condiz com o padrão normal (Figura 46A-E). No exposto, apesar dos artefatos de processamento, não são observadas diferenças morfológicas evidentes (Figura 46F-O). Ao nível de r7 o corte parece reduzido, porém esse formato é devido à incidência do corte (Figura 46 J). A marcação fluorescente é significativamente maior nos embriões controle em todos os níveis (Figura 47A). A distância de migração também é significativamente maior em todos os rombômeros no grupo controle (Figura 47B).

FIGURA 46 - CORTES HISTOLÓGICOS DOS ROMBÔMEROS DE EMBRIÕES DE *Gallus gallus* NO ESTÁDIO 18HH

Cortes histológicos imunomarcados para identificação de anti-HNK-1 (vermelho) e DAPI (azul) submetidos a técnica *free floating*. C.r representa embrião controle seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. E.r representa embrião exposto ao Pb seguido do respectivo rombômero indicado pelo número na imagem. TN: Tubo neural. N: Notocorda. PO: Placóide ótico (Lugar de destino ótico). VO: vesícula óptica. ad: Aorta dorsal. vc: Veia cardinal anterior. E: Esôfago. LT: Sulco laringo-traqueal. Seta: Células positivas para HNK-1. Seta larga: Gânglios formados por células HNK-1+. A-J: Barra = 100 µm. K-O: Barra = 50 µm. FONTE: A autora (2018).

FIGURA 47 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIO 18 HH, POR ROMBÔMERO



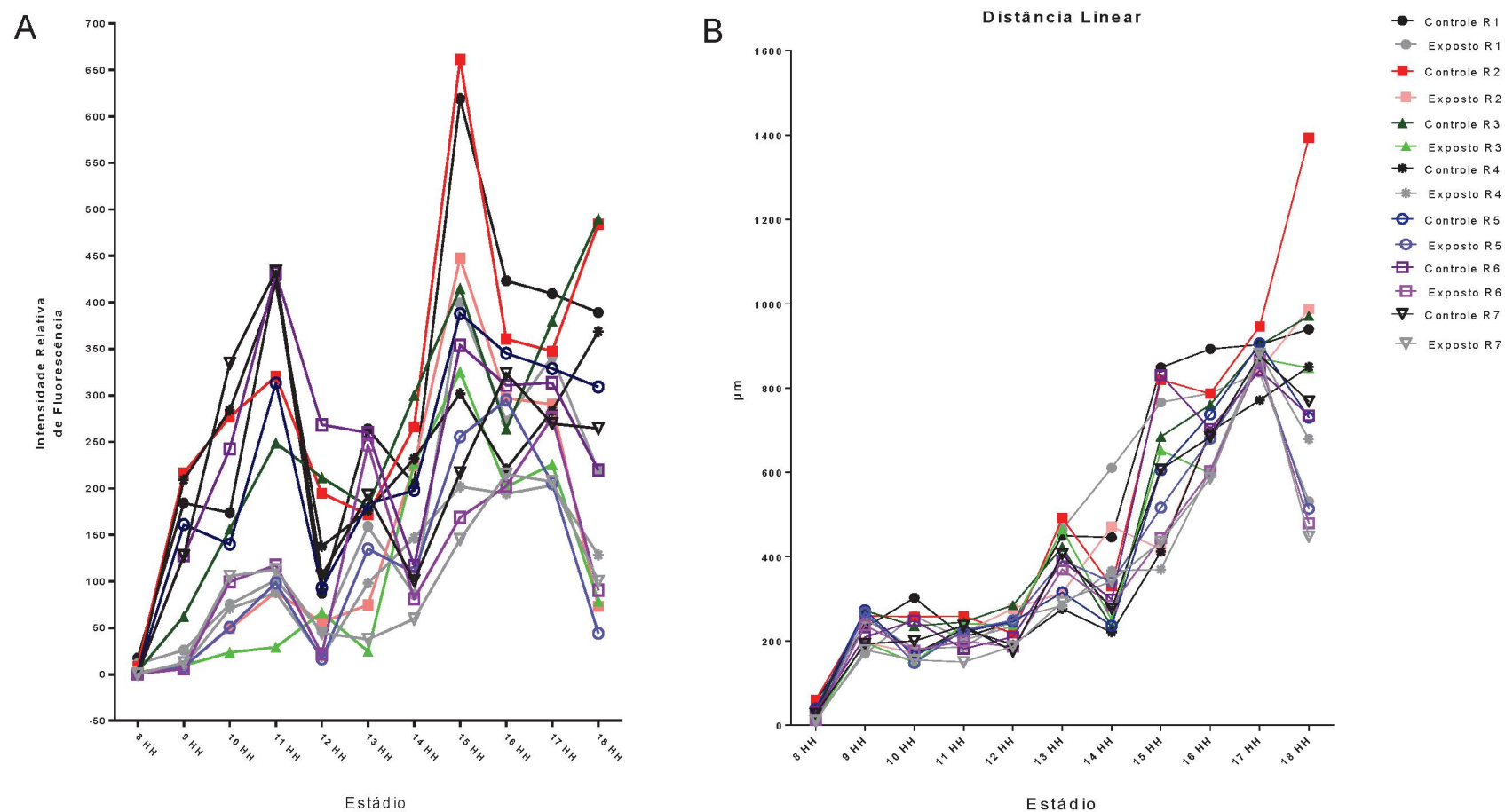
ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Média e erro padrão. A: Intensidade relativa de Fluorescência. B: Distância linear das células da crista neural cefálica. Controle  $n = 3$ . Exposto  $n = 2$ . FONTE: A autora (2018).



Após a análise individual de cada estágio embrionário, avaliamos marcação das células da CN cefálica e seu perfil da migração durante todos os estádios analisados. A intensidade de fluorescência mostra uma progressão durante o desenvolvimento, porém observa-se o aumento acentuado nos estádios 11 e 15HH. De modo geral, a intensidade de fluorescência, no grupo controle, foi maior em todos os rombômeros dos estádios de 8 a 18 HH, sendo esta diferença mais pronunciada no início do desenvolvimento, entre os estádios 8 ao 13HH (Figura 48A). Essa diferença pode ser evidenciada com riqueza de detalhes na figura 49, na qual a incidência de marcação no controle é intensa em comparação ao grupo exposto.

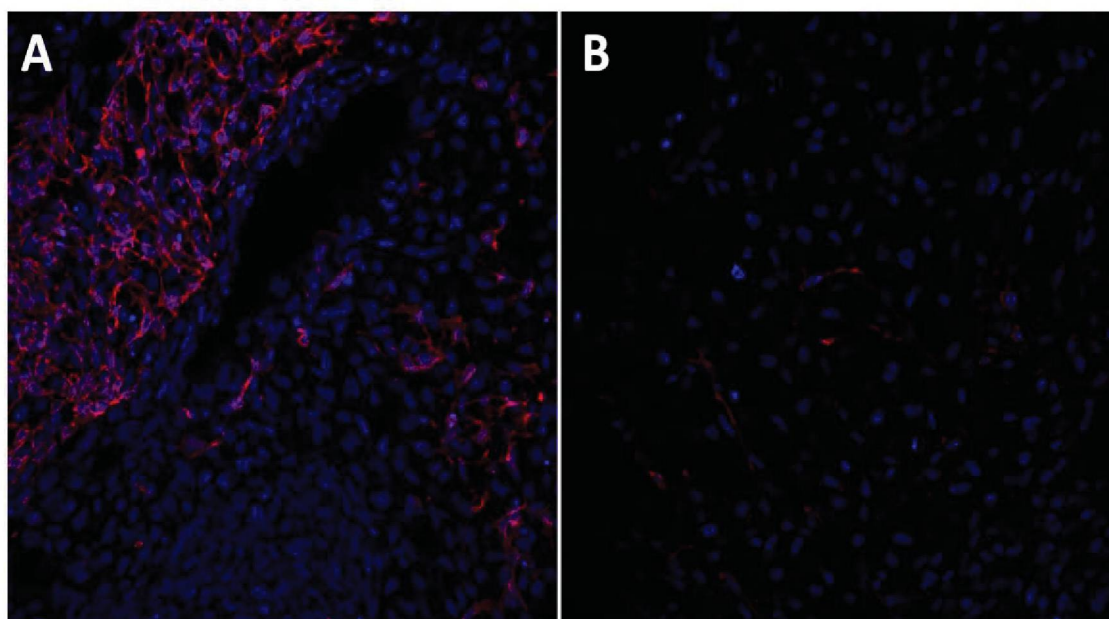
No perfil migratório entre os estádios estudados observa-se aumento progressivo na distância de migração. As células da CN de grupo controle, em geral, migram a uma distância maior em comparação ao grupo exposto na maioria dos estádios e níveis axiais analisados, no entanto, essa diferença é pouco acentuada. Mesmo assim, especialmente nos estádios mais tardios, é possível identificar uma diferença de até 500  $\mu\text{m}$  na distância de migração entre células controle e expostas. Em alguns níveis, a migração no grupo exposto é superior a observada no grupo controle (Figura 48B).

FIGURA 48 - INTENSIDADE RELATIVA DE FLUORESCÊNCIA E DISTÂNCIA LINEAR DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO IMUNOMARCADOS COM ANTI-HNK-1, ESTÁDIOS 8 AO 18 HH, POR ROMBÔMERO



A: Intensidade relativa de Fluorescência. B: Distância linear das células da crista neural cefálica. FONTE: A autora (2018).

FIGURA 49 - CÉLULAS HNK-1+ EM EMBRIÕES CONTROLE E EXPOSTO



Corte de embrião de *Gallus gallus* no estágio 18HH ao nível do 1º rombômero. A: Controle. B: Exposto.  
 FONTE: A autora (2018).

## 5 DISCUSSÃO

Em humanos, a concentração de chumbo na placenta pode variar de acordo com a região geográfica em que os indivíduos se encontram. Esteban-Vasallo e colaboradores (2012), em sua revisão sistemática, demonstraram que estes níveis variaram de 0,0018  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  a 0,5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , entre 1976 e 2011, sendo que na América do Sul, Ásia e no norte da África ainda são observados níveis muito elevados de Pb placentário. Sakamoto e colaboradores (2012) avaliaram a concentração de Pb no sangue materno, do cordão umbilical, no leite materno e no sangue do recém-nascido até os 3 meses após o parto, e verificaram concentrações de 0,0245  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , 0,0148  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , 0,00029  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  e 0,0153  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , respectivamente. Assim, a concentração utilizada neste trabalho é mais realística (0,015  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  de Pb), e considerando a similaridade filotípica no início do desenvolvimento dos embriões (IRIE; KURATANI, 2011), é possível a extrapolação de nossos resultados para outros organismos, entre eles o humano.

No presente trabalho foi observado que apenas parte do Pb está presente nos embriões. Isto indica uma dispersão do metal pelas estruturas do ovo. Kertész, Bakonyi e Farkas (2006) também quantificaram a presença de chumbo em ovos de embriões de ave, mas após imersão em solução de nitrato de chumbo (2,9  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) e verificaram que a concentração encontrada na casca do ovo era superior à detectada no albúmen e na gema,

que foram similares. Apesar da baixa concentração detectada no presente estudo, o Pb afeta a sobrevivência e interfere na formação das estruturas embrionárias. Esse dado corrobora com o descrito por Shefa e Héroux (2017) de que não existe uma dose segura de chumbo, pois mesmo nas menores concentrações ele pode promover um impacto negativo nos organismos. Isso deve estar relacionado ao fato do chumbo interagir, mimetizar ou substituir íons essenciais, como cálcio, zinco, magnésio e ferro em múltiplos processos (BRESSLER et al., 2007; FLORA et al., 2007; FLOREA et al., 2013; GARZA; VEJA; SOTO, 2006; LIDSKY; SCHNEIDER, 2003).

Nossos dados mostram-se particularmente preocupantes, considerando a concentração a qual os organismos em desenvolvimento estão comumente expostos, em especial o embrião/feto humano (ESTEBAN-VASALLO et al., 2012; SAKAMOTO et al., 2012). Em geral, baixos níveis de Pb são neurotóxicos em crianças e tem efeitos duradouros sobre o funcionamento neurocomportamental (LIDSKY; SCHNEIDER, 2003). Além disso, níveis inferiores a  $0,1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de Pb têm sido associados à redução no quociente de inteligência (QI), diminuição intelectual, alterações de hiperatividade e déficit de atenção (CANFIELD et al., 2003; LIDSKY; SCHNEIDER, 2003; KIM et al., 2013; LIU et al., 2014; TAYLOR et al., 2017). Deste modo, mesmo que alterações morfológicas e/ou anatômicas não sejam observadas em determinado organismo, isso não o torna isento de algum dano funcional.

Foi observado no grupo controle ocorrência de mortalidade e alterações anatômicas, porém estes dados são condizentes com a literatura, visto que diversos fatores, entre eles a idade da matriz, armazenagem e estocagem dos ovos antes da incubação podem interferir na viabilidade e anatomia embrionária (BOLELI, 2003; MESQUITA, 2011). Outros trabalhos com desenhos experimentais similares também demonstraram incidência de mortalidade e alterações morfológicas semelhantes nos controles veículos, em embriões injetados com solução fisiológica antes (YAMAMOTO et al., 2012; BORGES, 2017; KMECICK, 2017) e após a incubação (RIVERO et al., 2006; CARVALHO, 2007), indicando que a incidência de mortalidade e alterações estavam dentro da normalidade. Além disso, como Kmecick (2017) e Borges (2017) confirmaram não existir diferença na viabilidade de embriões injetados com solução fisiológica e os não injetados, não realizamos a comparação entre esses dois grupos, pois os desenhos experimentais eram parecidos.

O Pb é potencialmente tóxico para o desenvolvimento normal dos embriões de *Gallus gallus*, pois os embriões expostos a esse metal apresentaram aumento significativo



e progressivo na mortalidade. Assim, embriões em estádios mais tardios do desenvolvimento demonstram uma proporção de sobrevivência menor do que os embriões em estádios mais iniciais. Nossos resultados vão ao encontro de trabalhos anteriores que também evidenciaram o aumento na taxa de mortalidade de embriões de ave expostos a sais solúveis de chumbo. Borges (2017) ao realizar a exposição com a mesma concentração empregada neste trabalho antes da incubação, observou o aumento na taxa de mortalidade de 41% em embriões com 3 dias para 50% em embriões com 7 dias de incubação. Müller e colaboradores (2008) observaram maior incidência de mortalidade na primeira semana de incubação (43,9%) em comparação às duas semanas seguintes (aproximadamente 30% e 20%, para a segunda e terceira semana, respectivamente), em embriões expostos a concentração de  $0,28 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ , porém injetados no 5º dia de incubação.

Nesse estudo todos os embriões (controle e exposto) passaram pelos 3 primeiros períodos críticos descritos por Christensen (2001). Dewitt, Mayer e Henshel (2005) demonstraram que a exposição após o 4º dia elimina possíveis efeitos toxicológicos no período sensível da organogênese durante o desenvolvimento inicial, o que não ocorre com a exposição antes do início da incubação. Assim, nossos achados e de Borges (2017) sustentam a hipótese de que a exposição em períodos iniciais do desenvolvimento é mais crítica em comparação a estádios mais tardios.

Trabalhos que empregaram outros contaminantes, porém em altas concentrações, também evidenciaram a progressão na ocorrência de mortalidade. Carvalho (2007) ao expor embriões de ave ao metilmercúrio na concentração de  $2 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  no 5º dia de incubação, observou uma progressão na mortalidade, sendo de 10% e 80% na segunda e terceira semana de incubação, respectivamente. Borges (2017) também observou aumento na taxa de mortalidade em embriões com 3 e 7 dias, expostos antes da incubação a duas concentrações de arsênio ( $0,02 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  e  $0,2 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ).

Outro fator que pode ser relacionado ao aumento na taxa de mortalidade, além do tempo de exposição, é a concentração do composto tóxico ao qual o organismo está sendo exposto. Considerando que utilizamos apenas uma concentração, esse parâmetro não foi comprovado neste trabalho. Os trabalhos de Borges (2017) e Müller e colaboradores (2008) reforçam essa ideia, pois observaram aumento na ocorrência de mortalidade em embriões de ave expostos a diferentes concentrações de sais de chumbo. Estudos empregando outros contaminantes descreveram achados semelhantes. Kmecick (2017) verificou aumento na mortalidade em embriões de *G. gallus* com 3 dias de

desenvolvimento, expostos antes da incubação a diferentes concentrações de cádmio (Cd) e ácido perfluorooctanóico (PFOA). Em embriões de *Danio rerio* também é observado aumento na mortalidade após exposição a diferentes concentrações de chumbo (DOU; ZHANG, 2011).

O modelo utilizado neste trabalho corresponde até a 6ª semana de desenvolvimento humano, aproximadamente (SADLER, 2016; HILL, 2017). De acordo com Moore, Persaud e Torchia (2013) a ação de agentes externos durante o período entre a fertilização e a terceira semana de gestação, em humanos, pode levar à morte embrionária. A formação dos órgãos ocorre entre a 3ª e 8ª semana de gestação humana, sendo que durante esse período os organismos são bastante sensíveis e perturbações no desenvolvimento durante essa fase podem gerar grandes anomalias em diversos sistemas, como o sistema nervoso central (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2013). Esses dados indicam a relevância dos achados apresentados, uma vez que a concentração testada é realística e há similaridade filotípica entre as espécies, permitindo assim, com certa prudência, a extrapolação para outros organismos (HILL, 2017).

Nossos resultados mostram um aumento na ocorrência e progressão de alterações anatômicas nos embriões expostos ao Pb. Observa-se uma grande incidência de formação aberrante da região cefálica e de pontos hemorrágicos, confirmando dados da literatura que o chumbo é um contaminante conhecido por seus efeitos neurotóxicos (MOREIRA; MOREIRA, 2004b; MÜLLER et al., 2008) e também por promover hemorragias intra e extraembrionárias (NARBAITZ; MARINO; SARKAR, 1985; SCHATZ, 2003).

A progressão na ocorrência de malformações indica que a exposição ao contaminante promoveu falhas no desenvolvimento normal dos embriões, visto que essas alterações foram mais pronunciadas em estádios mais avançados de desenvolvimento. Muitos trabalhos evidenciaram o aumento na ocorrência de malformações embrionárias após a exposição a compostos tóxicos (DI RENZO et al., 2006; CARVALHO, 2007; YAMAMOTO et al., 2012; ROY et al., 2014; LI et al., 2016; BORGES, 2017; KMECICK, 2017; ZHANG, P. et al., 2017). No entanto, poucos estudos correlacionam a exposição a diferentes contaminantes ao aumento progressivo de alterações morfológicas e/ou anatômicas. Roy e colaboradores (2014) identificaram aumento na incidência de malformações de embriões de *Danio rerio* expostos a concentração de 0,65 µg.ml<sup>-1</sup> de acetato de chumbo em avaliações progressivas do desenvolvimento, corroborando com o presente trabalho. Porém, diferente do observado neste trabalho, Borges (2017) verificou

que embriões de ave com 3 e 7 dias de incubação expostos a  $0,025 \mu\text{g.ml}^{-1}$  de nitrato de chumbo apresentavam uma taxa de malformações de 70% e 60%, respectivamente. Entretanto, em concentrações 10 e 100 vezes mais elevadas a ocorrência das malformações foram progressivas, com grande incidência de malformações encefálicas e do tubo neural. É importante ressaltar que em nosso trabalho os embriões foram expostos ainda no estágio de blástula e seu desenvolvimento seguiu com a incubação. Como houve um aumento progressivo tanto na ocorrência de mortalidade quanto de malformações, provavelmente os embriões analisados em estádios mais tardios possivelmente apresentariam alguma anormalidade anatômica mais severa ou não sobreviveriam se incubados por mais tempo.

Em trabalhos que avaliam alterações morfológicas em embriões de *G. gallus* expostos a sais solúveis de chumbo, são identificados vários tipos de malformações em diferentes proporções, sendo, geralmente, dependentes da dose e tempo de exposição (RIVERO et al., 2006; BORGES, 2017). Os efeitos nocivos dos sais de chumbo foram demonstrados em embriões de ave em concentrações relativamente altas, variando entre  $15$  e  $45 \mu\text{g.ml}^{-1}$  (SCHATZ, 2003, RIVERO, 2005). Rivero (2005) relacionou a exposição ao Pb com redução temporária no peso após a eclosão, intensa deposição do metal no cerebelo, alteração na morfologia celular, apoptose em células do córtex cerebelar e alterações comportamentais. Schatz (2003) observou alterações morfológicas em embriões com 9 e 11 dias de desenvolvimento e deposição de Pb na medula, no entanto não verificou aumento significativo na apoptose de células ao redor do canal central, sulco lateral anterior e na camada marginal da medula.

Kmecick (2017) relacionou alterações promovidas pela exposição a contaminantes (Cd e PFOA), em embriões de ave, às anormalidades observadas durante o desenvolvimento humano. Essa correlação também pode ser aplicada em nosso trabalho, visto que algumas das malformações observadas nos embriões após a exposição ao Pb já foram observadas em humanos e relacionadas com a exposição a esse metal, como defeitos no fechamento do tubo neural e alterações cefálicas (SINGLA; SAHAI; GREWAL, 2009; HUANG et al., 2011; JIN et al., 2013), que podem ser associados a malformações futuras no organismo em estágios mais adiantados do desenvolvimento. Dependendo do nível axial onde ocorre a falha no fechamento do tubo neural, esse defeito pode gerar diferentes anomalias, sendo mais comuns a anencefalia na porção mais anterior (caracterizada pela ausência do encéfalo e crânio) e mielomeningocele (espinha bífida aberta) na região posterior (GILBERT, 2010; BONHOTAL, 2015). Outra anomalia



observada foi a redução do comprimento caudal, que pode ser relacionada à síndrome da regressão caudal, que é uma malformação congênita rara dos segmentos inferiores da coluna vertebral e medula espinhal (KOKRDOVA, 2013). Além disso, as alterações na curvatura corporal dos embriões podem ser associadas com malformações futuras da coluna vertebral (BUCKLEY; GUILLE, 2010; FARLEY, 2010; LOUGHENBURY; GUMMERSON; TSIRIKOS, 2017).

Nos embriões controle não foram observadas marcações positivas para o chumbo ao utilizarmos o *Leadmium Green*, porém nos embriões expostos nota-se marcação positiva para o metal mais acentuada na região cefálica e caudal. Destaca-se que a avaliação da localização do Pb no embrião inteiro é inédita na literatura, sendo este o primeiro trabalho a apresentar a utilização do marcador para essa finalidade. Kmecick (2017) também observou uma concentração de fluorescência para o cádmio nestas regiões, quando os embriões de 3 dias foram expostos ao Cd 0,5 e 5,0 pg.ml<sup>-1</sup>. Mesmo com a identificação do Pb no embrião inteiro, essa técnica não permitiu, até o momento, a avaliação da deposição do metal ao nível celular. Sugerimos que isso se deve a baixa estabilidade do marcador, pois foram necessários diversos processos antes de sua observação no microscópio. A espessura do embrião também pode ser outro interferente, visto que a capacidade do microscópio confocal para aquisição de imagens em grandes profundidades é limitada. Desta forma a utilização da microscopia intravital (MASEDUNCAS et al., 2013) mostra-se uma alternativa para o emprego eficaz deste marcador, já que a utilização do microscópio intravital manteria a estabilidade do marcador por maior tempo, além de permitir o alcance de maior profundidade no tecido. Porém, apesar de nossos esforços, não foi possível adaptar a metodologia do intravital para embriões de ave.

Devido a impossibilidade de observar o Pb ao nível celular com o marcador *Leadmium Green*, utilizamos a técnica de autometalografia. Nas amostras controle não foram identificadas marcações positivas para o Pb. Nos embriões expostos foi detectada a presença de chumbo nas células, mas sem um padrão específico ou uma relação direta entre a deposição do metal e as rotas migratórias das células da crista neural cefálica. Mesmo com a distribuição por todo tecido cefálico podemos correlacionar a deposição no rombencéfalo com o descrito por Rivero (2005), que detectou a presença de Pb no cerebelo de animais nascidos, mas quando expostos a duas doses de acetato de chumbo, no 3° e 5° dia de incubação. Schatz (2003) também evidenciou a deposição do chumbo na medula de embriões de ave no 9° e 11° dias de incubação, em embriões expostos no



3° e 5° dia, respectivamente. Também foi relatada a distribuição de Pb na medula de ratos expostos a diferentes concentrações (REHMAN, 1984; SCHRÖDER et al., 1978). Esses achados estão em concordância, pois o rombencéfalo dá origem ao cerebelo e à medula oblongada (BELLAIRS; OSMOND, 2014).

Em alguns cortes foram encontrados grupamentos celulares anormais na luz do tubo neural, sendo que algumas células nesses acúmulos apresentavam marcação sutil para a presença de Pb. Posteriormente observamos que essas células também foram positivamente marcadas com o anticorpo anti-HNK-1. Rovasio e Battiato (2002) descreveram achados similares após a exposição de embriões de ave ao etanol, identificando, através de imunomarcação, que esses grupamentos eram formados por células da crista neural. Esses resultados podem ser relacionados com a alteração promovida pelo chumbo na expressão de moléculas de adesão (DEY et al., 2000), ou seja, o Pb reduz a capacidade das células aderirem a componentes de matriz, como fibronectina e vitronectina (GIULIANI et al., 2005). A expressão de algumas moléculas de adesão como as caderinas ocorre em estágios precoces do desenvolvimento encefálico (HIRANO; SUZUKI; REDIES, 2000; TAKEICHI, 2007; REDIES; NEUDERT; LIN, 2011) e é necessária em diferentes processos, como a migração. Por exemplo, quando as células da CN delaminam a partir do tubo neural, essas células param de expressar N-Caderina (caderina neural), e então iniciam o processo de migração (THEVENEAU; MAYOR, 2014). Talvez, aqui, as células da CN estejam delaminando incorretamente do tubo neural e formando os acúmulos, através da alteração das moléculas anteriormente citadas. Borges (2017) observou o aumento na expressão de caderinas totais na região do tubo neural, em embriões expostos ao nitrato de Pb. Dentre as caderinas que podem estar sendo alteradas estão a N-caderina, E-caderina e Caderina 6B (ROGERS; SAXENA; BRONNER, 2013; SCHIFFMACHER et al., 2014; DADY; DUBAND, 2017).

Na imunomarcação foram avaliados diferentes estádios embrionários (8-18HH). Destaca-se que a avaliação dos períodos iniciais, em especial no estágio 8HH, é de extrema importância pois é neste momento que as células da crista neural cefálica são formadas e delaminam a partir do ápice dorsal do tubo neural, seguindo a via dorsolateral de migração (LE DOUARIN; KALCHEIN, 1999; KUO; ERICKSON, 2010). Deste modo qualquer falha neste período pode comprometer o desenvolvimento embrionário normal. Ao analisar os cortes dos embriões controle observamos que as características morfológicas foram condizentes com o padrão normal de desenvolvimento para cada estágio (HAMBURGER; HAMILTON, 1951; BELLAIRS; OSMOND, 2014). Já nos

embriões expostos foram identificadas alterações morfológicas, bem como grupamentos celulares ectópicos na luz do TN.

Todos os estádios analisados nos embriões expostos apresentaram diminuição na intensidade relativa de fluorescência após marcação com anticorpo específico para células da CN, sugerindo que houve redução no número de células da crista neural cefálica após a exposição ao chumbo. Propõe-se que a diminuição no número de células da CN pode ocorrer por uma falha na transição de epitélio para mesênquima (EMT), como resultado da exposição ao Pb. No início da EMT da CN, a expressão alterada de moléculas de adesão celular dependentes do  $\text{Ca}^{2+}$ , como as caderinas, perturba as adesões célula-célula (ODA; TAKEICHI, 2011). Apesar dos mecanismos de toxicidade do Pb não serem completamente compreendidos, sabe-se que ele pode substituir ou mimetizar o  $\text{Ca}^{2+}$  (FLORA; AGRAWAL, 2017) e, assim, um possível alvo de toxicidade sejam as moléculas de adesão (PROZIALECK et al., 2002; GIULIANI et al., 2005). Porém, não se pode excluir a possibilidade de que essas células não estejam proliferando ou sofrendo apoptose. Não há relatos de que o Pb induz a morte ou a redução na proliferação desta população celular, mas trabalhos utilizando outros contaminantes evidenciaram tanto apoptose quanto redução na proliferação das células da CN (CARTWRIGHT; TESSMER; SMITH, 1998; USAMI et al., 2015; LI et al., 2016; WANG et al., 2016; ZHANG, P. et al., 2017).

A redução na taxa de migração de células da crista neural após a exposição a sais de chumbo também foi demonstrada por Zimmer e colaboradores (2012) e Usami e colaboradores (2015). Alguns metais afetam negativamente as células da crista neural, alterando particularmente sua migração. O chumbo, dependendo da concentração, pode reduzir em até 75% a taxa migratória dessas células (ZIMMER et al., 2012). Esses resultados vão ao encontro com o descrito em nosso trabalho, uma vez que é possível observar redução na migração das células HNK-1+. Porém, os trabalhos citados acima foram realizados com culturas celulares, sendo o primeiro em células da crista neural humana e o segundo com células da crista neural cefálica de ratos.

Ressaltamos aqui a importância do modelo e desenho experimental empregado, pois a formação e migração das células da crista neural, com regiões nas quais o fluxo migratório é segregado, dependem de uma série de sinais, bem como do tecido circundante. À medida que as células da CN migram tornam-se mais específicas e adquirem certas restrições de padrões através de uma variedade de interações com o tecido (FISH; SCHNEIDER, 2014). O contato dessas células com o neuroepitélio no

momento da migração e a exposição a sinais moleculares, como o fator de crescimento de fibroblastos 8 (FGF8) no limite entre mesencéfalo e o rombencéfalo, fornecem informações necessárias para a morfogênese subsequente nos arcos branquiais (COULY et al., 1998; TRAINOR; ARIZA-MCNAUGHTON; KRUMLAUF, 2002). Da mesma forma, as interações com mesoderme paraxial ao nível do tubo neural (TRAINOR; KRUMLAUF, 2000; LADHER et al., 2005), ectoderme superficial e endoderme nos arcos branquiais (COULY et al., 2002; LE DOUARIN et al., 2004), e a ectoderme facial ao longo do processo frontonasal afetam o destino das células da CN e são necessárias para manter a histogênese e morfogênese adequada de seus derivados. Isto é válido especialmente para a esqueletogênese, onde endoderme e ectoderme de superfície fornecem sinais, especialmente FGFs, BMPs e *sonic hedgehog* (SHH), que regulam positivamente a formação óssea e cartilaginosa (CRUMP et al., 2004; FISH; SCHNEIDER, 2014). Um aspecto importante sobre a crista neural é que ela, além de receber sinais de outras células para atingir alvos específicos, influencia o desenvolvimento dos tecidos com os quais interage durante sua migração (THEVENEAU; MAYOR, 2014). Assim, a avaliação das células da crista neural *in situ* mostra-se fundamental, pois o tecido disponibiliza sinais necessários para a migração.

As alterações na migração e no número de células da CN cefálica observadas após a exposição ao Pb, associadas ao não fechamento do tubo neural a partir de r5 no estágio 9HH e as anormalidades encontradas em 10HH, nos sugerem atraso e anomalias no desenvolvimento cefálico. Esses achados vão ao encontro com os trabalhos de Huang e colaboradores (2011) e Singla, Sahai e Grewal (2009) que associaram a exposição materna ao chumbo à presença de defeitos no tubo neural, ocasionando problemas futuros em crianças. Do mesmo modo Bound e colaboradores (1997) e Demir e colaboradores (2017) associaram as concentrações plasmáticas de chumbo (materna e infantil) à incidência de defeitos no tubo neural.

Nos estádios posteriores, nos embriões expostos, observamos alterações morfológicas, sendo mais frequentemente identificada a falha no fechamento do TN com a presença de massas celulares em seu ápice. A literatura descreve que a falha no fechamento do tubo neural pode promover diferentes perturbações no desenvolvimento, como, por exemplo, anencefalia (GILBERT, 2010; BONHOTAL, 2015) e as massas celulares podem ser associadas a alterações morfológicas e funcionais no desenvolvimento futuro do encéfalo, uma vez que modificam a estrutura normal do tubo neural (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2013; SADLER, 2016). Além disso, também



foi identificada uma diminuição de células da CN nos locais de futuros gânglios cranianos. Até o momento, não há na literatura uma associação direta entre a exposição ao Pb, alteração das células da crista neural e formação ou atividade dos gânglios cranianos. Os gânglios desempenham funções essenciais no organismo. Por exemplo, o gânglio trigêmeo está relacionado ao desenvolvimento do nervo ótico e das estruturas maxilares e mandibulares, enquanto o gânglio facial e vestibuloacústico estão envolvidos na formação do epitélio auditivo, sendo os dois formados parcialmente por células da CN que migram de r4. Já o gânglio glossofaríngeo está relacionado à formação da musculatura faríngea e glândulas salivares e são formados a partir de células da CN que migram de r6. No presente trabalho observamos, nos embriões expostos, ao nível de r4, r5 e r6, uma formação diminuída da região dos futuros gânglios cranianos. Há trabalhos associando a exposição ao Pb com problemas na formação de conceitos verbais e no domínio de linguagem (MASON; HARP; HAN, 2014), além de alterações no equilíbrio postural, na maturação visual, na discriminação olfativa e memória olfativa (LOCKITCH, 1993; GULSON; YUI; HOWARTH, 1998; MAMELI et al., 2001; ZHANG, B. et al., 2017). Lurie, Brooks e Gray (2006) descreveram alteração no tronco cerebral auditivo, em aves, após a exposição ao Pb. Considerando que os gânglios cranianos contribuem para a formação das estruturas envolvidas nos processos descritos acima, alterações na migração ou no número de células da crista neural cefálica indicam uma forte preocupação para anormalidades morfofuncionais associadas.

Observamos neste estudo a alteração na rota migratória, em alguns embriões expostos, principalmente em estádios mais tardios do desenvolvimento. Na região cefálica essa mudança é particularmente preocupante, pois esta região é a única com capacidade de formar o esqueleto e cartilagem facial (LE LIEVRE; LE DOUARIN, 1975; NAKAMURA; AYER-LE LIEVRE, 1982; KUO; ERICKSON, 2010). Noden (1983) substituiu regiões da crista que originariam o segundo arco branquial, por células que normalmente migram para o primeiro arco e observou que os embriões produziram dois conjuntos de estruturas mandibulares. Nesses estádios posteriores não foram observadas alterações proeminentes na morfologia dos cortes analisados. Isso pode ser relacionado ao fato de que anormalidades severas são inconsistentes com a sobrevivência embrionária, como demonstrado na análise anatômica e progressão da mortalidade, descrita no presente estudo.

Como citado anteriormente a alteração no padrão migratório das células da crista neural é bastante preocupante. No entanto, apesar dos dados indicados nos trabalhos



anteriormente referidos, até o momento a literatura não descreve um padrão temporal e em diferentes níveis axiais. Igualmente não existem estudos que avaliem esse padrão frente a exposição ao Pb, tornando essa a primeira descrição desse escopo (vários estádios). De acordo com Giovannone e colaboradores (2015), embora o padrão de migração exclusivo das células da crista neural tenha sido elegantemente demonstrado em diferentes manuscritos, não foi atualizado com capacidade de microscopias mais modernas. Desta forma, nosso estudo mostra-se precursor.

Em resumo, o presente estudo reforça a preocupação de uma exposição ao Pb, em baixas concentrações visto que foram observados diferentes efeitos sobre o organismo embrionário em desenvolvimento e sobre as células da CN mesmo em concentrações bastante baixas. Além disso, foi demonstrado pela primeira vez a biodisponibilidade desse metal no organismo embrionário de ave no início do desenvolvimento e o padrão migratório das células da CN cefálica a nível dos rombômeros frente a exposição ao Pb. Considerando a similaridade entre os organismos vertebrados, acredita-se que nossos resultados possam ser extrapolados, com ponderação, a outros organismos. No entanto, ainda são necessários mais estudos sobre os efeitos do contaminante e seu mecanismo de ação, sobretudo em moléculas envolvidas nos processos migratórios das células da CN.

## 6 CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados, concluiu-se que, nas condições experimentais em que o presente trabalho foi desenvolvido:

- Apenas parte do Pb inserido nos ovos, cerca de 25%, chega aos embriões.
- O Pb, apesar da baixa concentração, aumenta a ocorrência de mortalidade e promove alterações anatômicas no padrão corporal normal dos embriões ao longo do desenvolvimento.
- O Pb encontra-se disperso por toda a região cefálica analisada nos embriões expostos.
- O Pb interfere com o número de células da CN cefálica, com a distância percorrida por elas nos tecidos, além de sua rota migratória.
- O Pb altera os padrões de delaminação, migração e comunicação das células da crista neural cefálica.
- O padrão morfológico, associado às alterações na migração, é condizente com anormalidades morfofuncionais relatadas na literatura.

## REFERÊNCIAS

- ANWER, J.; ALI, S.; MEHROTRA, N. K. Antagonistic effect of zinc in lead treated developing chick embryos. **Drug and chemical toxicology**, v.11, n.1 p. 85-95, 1988.
- ATKINS, P. W.; JONES, L. L. **Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Porto Alegre: Bookman, 2001.
- ATOBATELE, O. E.; OLUTONA, G. O. Distribution of three non-essential trace metals (Cadmium, Mercury and Lead) in the organs of fish from Aiba Reservoir, Iwo, Nigeria. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 896-903, 2015.
- ATSDR - **Agency for toxic substances & disease registry**. Case studies in environmental medicine - lead toxicity. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1992.
- ATSDR - **Agency for toxic substances & disease registry**. Toxicological profile for lead. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1999.
- ATSDR - **Agency for toxic substances & disease registry**. Priority list of hazardous substances, 2015.
- BAIKA, L. M. ; DOS SANTOS, E. J.; HERRMANN, A. B.; GRASSI, M.T. Simultaneous determination of As, Hg, Sb and Se in mineral fertilizers using ultrasonic extraction and CGV-ICP OES. **Analytical Methods**, v. 8, p. 8362-8367, 2016.
- BASU, N.; HAEDA, J.; NAMA, D. H.; PILSENERD, J. R.; CARVANE, M. J.; CHANF H. M.; GOETZG, F. H.; MURPHYH, C. A.; ROUVINEN-WATTI, K.; SCHEUHAMMER, A. M. Effects of methylmercury on epigenetic markers in three model species: mink, chicken and yellow perch. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 157, n. 3, p. 322–7, 2013.
- BELLAIRS, R.; OSMOND, M. **The Atlas of Chick Development**. 3. ed. San Diego: Elsevier, 2014.
- BERNARDO, A. M.; THORSTEINSDÓTTIR, S.; MUMMERY, C. Advantages of the avian model for human ovarian cancer (Review). **Molecular and Clinical Oncology**, v. 3, n. 6, p. 1191-1198, 2015.
- BIRGBAUER, E.; SECHRIST, J.; BRONNER-FRASER, M.; FRASER, S. Rhombomeric origin and rostrocaudal reassortment of neural crest cells revealed by intravital microscopy. **Development**, v. 121, n. 4, p. 935-945, 1995.
- BJØRNSTAD, S.; AUSTDAL, L. P.; ROALD, B.; GLOVER, J. C.; PAULSEN, R. E. Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 355, n. 3, p. 386-396, 2015.

BOCCHI, N.; FERRACIN, L. C.; BIAGGIO, S. R. Pilhas e baterias: Funcionamento e impacto ambiental. **Química Nova na Escola**, v. 11, p. 3-9, 2000.

BOLELI, I.C. Estresse, mortalidade e malformações embrionárias. In: MACARI, M.; GONZALES, E. **Manejo da incubação**. Campinas: FACTA, 2003. p. 394-434.

BONHOTAL, S. Screening and Risk Factors for Anencephaly. **The Journal of Nurse Practitioners**, v. 11, n. 3, p. 371-372, 2015.

BONONI, J.; COLE, A.; TEWSON, P.; SCHUMACHER, A.; BRADLEY, R. Chicken protocadherin-1 functions to localize neural crest cells to the dorsal root ganglia during PNS formation. **Mechanisms of development**, v. 125, n. 11-12, p. 1033-1047, 2008.

BORGES, M. E. **Uso do embrião de ave (gallus gallus) como organismo modelo modelo para emrbiotoxicidade do Pb e As**. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

BOUND, J. P.; HARVEY, P. W.; FRANCIS, B. J.; AWWAD, F.; GATRELL, A. C. Involvement of deprivation and environmental lead in neural tube defects: a matched case-control study. **Archives of disease in childhood**, v. 76, n. 2, p. 107-112, 1997.

BRESSLER, J. P.; OLIVI, L.; CHEONG, J. H.; KIM, Y.; MAERTEN, A.; BANNON, D. Metal transporters in intestine and brain: their involvement in metal-associated neurotoxicities. **Human & experimental toxicology**, v. 26, n. 3, p. 221-229, 2007.

BRONNER, M. E.; SIMÕES-COSTA, M. The Neural Crest Migrating into the twenty-First Century. In: Essays on development biology, Part A. Edited by Paul M. Wassarman 1<sup>st</sup> Ed. California: Elsevier, 2016. p. 115-130.

BRONNER-FRASER, M. Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using the monoclonal antibody HNK-1. **Developmental Biology**, v 115, n. 1, p. 44-55, 1986.

BRONNER-FRASER, M. Neural crest cell formation and migration in developing embryo. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 8, n. 10, p. 609-706, 1994.

BRUNETTI, P.; ZANELLA, L.; PAOLIS, A.; LITTA, D. D.; CECCHETTI, V.; FALASCA, G.; BARBIERI, M.; ALTAMURA, M. M.; COSTANTINO, P.; CARDERELLI, M. Cadmium-inducible expression of the ABC-type transporter AtABCC3 increases phytochelatin-mediated cadmium tolerance in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 13, p. 3815-3829, 2015.

BUCKLEY, P. S.; GUILLE, J. T. Evaluation of the Patient with a Congenital Spinal Deformity. **Seminars in Spine Surgery**, v. 22, n. 3, p. 113-117, 2010.

CANFIELD, R. L.; HENDERSON, C. R. JR.; CORY-SLECHTA, D. A.; COX, C.; JUSKO, T. A.; LANPHEAR, B. P. Intellectual impairment in children with blood lead



concentrations below 10 microg per deciliter. **The New England journal of medicine**, v. 348, n. 16, p. 1517-1526, 2003.

CAPITANI, E. M. Metabolismo e toxicidade do chumbo na criança e no adulto. **Revista da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto – Simpósio Chumbo e a Saúde Humana**, v. 42, n. 3, p. 278-286, 2009.

CAROCCI, A.; CATALANO, A.; LAURIA, G.; SINICROPI, M. S.; GENCHI, G. Lead Toxicity, Antioxidant Defense and Environment. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 238, p.45-67, 2016.

CARTWRIGHT, M. M.; TESSMER, L. L.; SMITH, S. M. Ethanol-induced neural crest apoptosis is coincident with their endogenous death, but is mechanistically distinct. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v. 22, n. 1, p. 142-149, 1998.

CARVALHO, M. C. **Efeitos neurotóxicos da exposição perinatal ao metilmercúrio em *Gallus domesticus***. Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

CATINO, S.; TUTINO, M.; RUGGIERI, S.; MARINACCIO, C.; GIUA, R.; GENNARO, G.; CORSEB, P.; ASSENNATO, G.; RIBATTI, D. Angiogenic activity in vivo of the particulate matter (PM10). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, p. 156-161, 2017.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Interpreting and Managing Blood Lead Levels <10 µg/dL in Children and Reducing Childhood Exposures to Lead, 2007.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Lead Home Page. Atlanta. 2012. Disponível em: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov). Acesso em: 22 dez. 2017.

CHRISTENSEN, . L. Factors associated with early embryonic mortality. **World's Poultry Science Journal**, v. 57, p. 359-372, 2001.

COULY, G.; CREUZET, S.; BENNACEUR, S.; VINCENT, C.; LE DOUARIN, N. M. Interactions between Hox-negative cephalic neural crest cells and the foregut endoderm in patterning the facial skeleton in the vertebrate head. **Development**, v. 129, n. 4, p. 1061-1073, 2002.

COULY, G.; GRAPIN-BOTTON, A.; COLTEY, P.; RUHIN, B.; LE DOUARIN, N. M. Determination of the identity of the derivatives of the cephalic neural crest: incompatibility between Hox gene expression and lower jaw development. **Development**, v. 125, n. 17, p. 3445-3459, 1998.

CREUZET, S. E. Regulation of pre-otic brain development by cephalic neural crest. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 106, n. 37, p. 15774-15779, 2009.

CRINNION, J. W. Maternal Levels of Xenobiotics that Affect Fetal Development and Childhood Health. **Alternative Medicine Review**, v. 14, n. 3, p. 212-222, 2009.

CRUMP, J. G.; MAVES, L.; LAWSON, N. D.; WEINSTEIN, B. M.; KIMMEL, C. B. An essential role for Fgfs in endodermal pouch formation influences later craniofacial skeletal patterning. **Development**, v. 131, n. 22, p. 5703-5716, 2004.

DADY, A.; DUBAND, J. L. Cadherin interplay during neural crest segregation from the non-neural ectoderm and neural tube in the early chick embryo. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 246, n. 7, p. 550-565, 2017.

DANSCHER, G. Autometallography. A new technique for light and electron microscopic visualization of methals in biological tissue (gold, silver, metal sulphides and metals selenides). **Histochemistry**, v. 81, n. 4, p. 331-335, 1984.

DARTEY, E.; BERLINGER, B.; WEINBRUCH, S.; THOMASSEN, Y.; ODLAND, J. O.; BROX, J.; NARTEY, V. K.; YEBOAH, F. A.; ELLINGSEN, D. G. Essential and non-essential trace elements among working populations in Ghana. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 44, p. 279-287, 2017.

DAVA FOODS. **The structure of the egg**. Disponível em: <http://www.davafoods.com/the-egg/structure-of-the-egg.aspx> . Acesso em: 24 mai 2017.

DAVEY, M. G.; TICKLE, C. The chicken as a model for embryonic development. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 117, p. 231-239, 2007.

DEMIR, N.; BAŞARANOĞLU, M.; HUYUT, Z.; DEĞER, İ.; KARAMAN, K.; ŞEKEROĞLU, M. R.; TUNCER, O. The relationship between mother and infant plasma trace element and heavy metal levels and the risk of neural tube defect in infants. **Journal of maternal-fetal and neonatal medicine**, v. 3, p. 1-8, 2017.

DEY, P. M.; BURGER, J.; GOCHFELD, M.; REUHL, K. R. Developmental lead exposure disturbs expression of synaptic cell adhesion molecules in herring gull brains. **Toxicology**, v. 146, p. 137-147, 2000.

DEWITT, J. C.; MEYER, E. B.; HENSHEL, D. S. Enviromental toxicity studies using chickens as surrogates for wildlife: effects of injection day. **Archive of environmental cantamination and toxicology**, v. 48, n. 2, p. 270-277, 2005.

DI RENZO, F.; BROCCIA, M. L.; GIAVINI, E.; MENEGOLA, E. Antifungal triazole derivative triadimefon induces ectopic maxillary cartilage by altering the morphogenesis of the first branchial arch. **Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology**, v. 80, n. 1, p. 02-11, 2006.

DOU, C.; ZHANG, J. Effects of lead on neurogenesis during zebrafish embryonic brain development. **Journal of Hazardous Materials**, v. 194, p. 277-282, 2011.

DURSKA, G. Levels of lead and cadmium in pregnant women and newborns and evaluation of their impact on child development. **Annales Academiae Medicae Stetinensis**, v. 47, p. 49-60, 2001.

EFSA. European Food Safety Authority. Lead dietary exposure in the European population. **EFSA Journal**, v. 10, n. 7: 2831, 2012.

EPA - U.S. EPA Environmental Protection Agency. Alternative technologies for surface finishing: clear technologies for printed wiring board manufacturers. 2001. Disponível em [http://www.epa.gov/dfe/pubs/pwb/tech\\_rep/Surface\\_Finishing.pdf](http://www.epa.gov/dfe/pubs/pwb/tech_rep/Surface_Finishing.pdf). Acesso em 27 mai. 2017.

ERICKSON, C. A. Control of neural crest cell dispersion in the trunk of the avian embryo. **Development Biology**, v. 111, n. 1, p. 138-157, 1985.

ERICKSON, C. A.; PERRIS, R. The role of cell-cell and cell matrix interactions in the morphogenesis of the neural crest, **Development Biology**, v. 159, p. 60-54, 1993.

ESTEBAN-VASALLO, M. D.; ARAGONÉS, N.; POLLAN, M.; LÓPEZ-ABENTE, G.; PEREZ-GOMEZ, B. Mercury, Cadmium, and Lead Levels in Human Placenta: A Systematic Review. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 10, p. 1369-1377, 2012.

FARHAT, A.; CRUMP, D.; CHIU, S.; WILLIAMS, K. L.; LETCHER, R. J.; GAUTHIER, L. T.; KENNEDY, S. W. *In Ovo* effects of two organophosphate flame retardants-TCPP and TDCPP- on pipping success, development, mRNA expression, and thyroid hormone levels in chicken embryos. **Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology**, v. 134, n. 1, p. 92-102, 1 jul. 2013.

FARLEY, F.A. Etiology of Congenital Scoliosis. **Seminars in Spine Surgery**. v. 22, n. 3, p. 110-112, 2010.

FARLIE, P. G.; KERR, R.; THOMAS, P.; SYMES, T.; MINICHELLO, J.; HEARN, C. J.; NEWGREEN, D. A paraxial exclusion zone creates patterned cranial neural crest cell outgrowth adjacent to rhombomeres 3 and 5. **Developmental biology**, v.213, n. 1, p.70-84, 1999.

FISH, J. L.; SCHNEIDER, R. A. Neural Crest-Mediated Tissue Interactions During Craniofacial Development: The Origins of Species-Specific Pattern. In: TRAINOR, P. A. **Neural Crest Cell: Evolution, Development and Disease**. Academic Press is an imprint of Elsevier, 2014. p. 102-115.

FLORA, S. J.; FLORA, G. ; SAXENA, G. MISHRA, M. Arsenic and lead induced free radical generation and their reversibility following chelation. **Cellular and molecular biology**, v. 53, n. 1, p. 26-47, 2007.

FLORA, S. J. S; AGRAWAL, S. Arsenic, Cadmium, and Lead. In: Gupta, R. C. **Reproductive and Developmental Toxicology**. 2 ed. Academic Press. 2017. p. 551-557.

FLOREA, A.M., TABAN, J., VARGHESE, E., ALOST, B.T., MORENO, S., BÜSSELBERG, D. Lead (Pb<sup>2+</sup>) neurotoxicity: ion-mimicry with calcium (Ca<sup>2+</sup>) impairs synaptic transmission. A review with animated illustrations of the pre- and post-



synaptic effects of lead. **Journal of Local and Global Health Science**, v. 4, p. 01-38, 2013.

FREITAS, P. F. **Correlação entre distribuição de ephrinas-b e glicoconjugados pna-positivos e trajetos migratórios de células da crista neural: análise ao nível vagal em embriões de galinhas leghorn e sedosa japonesa ao nível do tronco**. Tese. (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GARZA, A.; VEJA, R.; SOTO, E. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 12, n. 3, p. RA57-RA65, 2006.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**, 9 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2010.

GIOVANNONE, D.; ORTEGA, B.; REYES, M.; EL-GHALI, N.; RABADI, M.; SAO, S.; BELLARD, M. L. Chicken trunk neural crest migration visualized with HNK-1. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 3, p. 255-266, 2015.

GIULIANI, R.; BETTONI, F.; LEALI, D.; MORANDINI, F.; APOSTOLI, P.; GRIGOLATO, P.; CESANA, B. M.; ALEO, M. F. Focal adhesion molecules as potential target of lead toxicity in NRK-52E cell line. **FEBS letters**, v. 579, n. 27, p. 6251-6258, 2005.

GODWIN, H. A. The biological chemistry of lead. **Current opinion in chemical biology**, v. 5, n. 2, p. 223-227, 2001.

GONZALES, E. Análise de problemas de eclodibilidade e fertilidade de plantéis avícolas por métodos de embriodiagnóstico. In: ZOOTECA, 2005, Campo Grande - MS. **Anais do Zootec 2005**.

GRANT, K.; GOLDIZEN, F. C.; SLY, P. D.; BRUNE, M. N.; NEIRA, M.; VAN DEN BERG, M.; NORMAN, R. E. Health consequences of exposure to e-waste: a systematic review. **The Lancet. Global health**, v. 1, n. 6, p. e350-361, 2013.

GULSON, B. L.; YUI, L. A.; HOWARTH, D. Delayed visual maturation and lead pollution. **The Science of the total environmen**, v. 224, n. 1-3, p. 215-219, 1998.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of morphology**, v. 88, n. 1, 1951.

HAN, Z.-J.; SONG, G.; CUI, Y.; XIA, H. F.; MA, X. Oxidative stress is implicated in arsenic-induced neural tube defects in chick embryos. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 7, p. 673-680, 2011.

HARRINGTON, E. K.; COON, D. J.; KERN, M. F.; SVOBODA, K. K. H. PTH stimulated growth and decreased Col-X deposition are phosphatidylinositol-3,4,5 triphosphate kinase and mitogen activating protein kinase dependent in avian sterna. **Anatomical record**, v. 293, n. 2, p. 225-234, 2010.



HAYRE, C. M.; BLACKMAN, S.; CARLTON, K.; EYDEN, A. Attitudes and perceptions of radiographers applying lead (Pb) protection in general radiography: An ethnographic study. **Radiography / the College of Radiographers**, v. 24, n. 1. p. e13-e18, 2018.

HEID, S. E.; WALKER, M. K.; SWANSON, H. I. Correlation of cardiotoxicity mediated by halogenated aromatic hydrocarbons to aryl hydrocarbon receptor activation. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 61, n. 1, p. 187–196, 2001.

HEIDEGGER, I.; KERN, J.; OFER, P.; KLOCKER, H. I. Oncogenic functions of IGF1R and INSR in prostate cancer include enhanced tumor growth, cell migration and angiogenesis. **Oncotarget**, v. 5, n. 9, p. 2723–2735, 2014.

HILL, M. A. **Embryology Carnegie Stage Comparison**. Disponível em <[https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie\\_Stage\\_Comparison](https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie_Stage_Comparison)>. Acesso em 28 fev. 2017.

HIRANO, S.; SUZUKI, S. T.; REDIES, C. The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 8, p. d306-d355, 2000.

HONG, Y. C.; KULKARNI, S. S.; LIM, Y. H.; KIM, E.; PARK, H.; KIM, Y.; KIM, B. N.; CHANG, N.; OH, S. Y.; KIM, Y. J.; PARK, C.; HA, E. Postnatal Growth Following Prenatal Lead Exposure and Calcium Intake. **Pediatrics**, v. 134, n. 6, p. 1151-1159, 2014.

HSIEH, C. L.; CHEN, K. C.; DING, C. Y.; TSAI, W. J.; WIU, J. F.; PENG, C. C. Valproic acid substantially downregulated genes folr1, IGF2R, RGS2, COL6A3, EDNRB, KLF6, and pax-3, N-acetylcysteine alleviated most of the induced gene alterations in chicken embryo model. **Romanian journal of morphology and embryology**, v. 54, n. 4, p. 993–1004, 2013.

HUANG, C.; KRATZER, M. C.; WEDLICH, D.; KASHEF, J. E-cadherin is required for cranial neural crest migration in *Xenopus laevis*. **Developmental biology**, v. 414, n. 2, p. 159-171, 2016.

HUANG, J.; WU, J. LI, T.; SONG, X.; ZHANG. B. ZHANG, P. ZHENG, X. Effect of exposure to trace elements in the soil on the prevalence of neural tube defects in a high-risk area of China. **Biomedical and environmental sciences : BES**, v. 24, n. 2, p. 94-101, 2011.

IRIE, N.; KURATANI, S. Comparative transcriptome analysis reveals vertebrate phylotypic period during organogenesis. **Nature Communications**, v. 2, n. 248, 2011.

JEDRYCHOWSKI, W.; PERERAB, F.; JANKOWSKIC, J.; RAUHB, V.; FLAKA, E.; CALDWELLD, K. L.; JONESD, R. L.; PACA, A.; LISOWSKA-MISZCZYK, I. Prenatal low-level lead exposure and developmental delay of infants at age 6 months (Krakow inner city study). **International journal of hygiene and environmental health**, v. 211, n. 3-4, p. 345-351, 2008.

JESSL, L.; SCHEIDER, J.; OEHLMANN J. The domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) embryo as an alternative for mammalian experiments – Validation of a test method for the detection of endocrine disrupting chemicals. **Chemosphere**, v. 196, p. 502-513, 2018.

JIN, L.; ZHANG, L.; LI, Z.; LIU, J. M. , YE, R.; REN, A. Placental concentrations of mercury, lead, cadmium, and arsenic and the risk of neural tube defects in a Chinese population. **Reproductive toxicology**, v. 35, p.25-31, 2013.

KAIN, K. H.; MILLER, J. W. I.; JONES-PARIS, C. R.; THOMASON, R. T.; LEWIS, J. D.; BADER, D. M.; BARNETT, J. V.; ZIJLSTRA. A. The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. **Developmental Dynamics**, v. 243, n. 2, p. 216–228, 2014.

KELDER, T. P.; VICENTE-STEIJN, R.; POELMANN, R. E.; MUMMERY, C. L.; DERUITER, M. C.; JONGBLOED, M.R. M. The avian embryo to study development of the cardiac conduction system. **Differentiation**, v. 91, n. 4-5, p. 90-103, 2016.

KERTÉSZ, V.; BAKONYI, G.; FARKAS, B. Water pollution by Cu and Pb can adversely affect mallard embryonic development. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, n. 1, p. 67-73, 2006.

KIM, S.; ARORA. M.; FERNANDEZ, C.; LANDERO, J.; CARUSO, J.; CHEN, A. Lead, mercury, and cadmium exposure and attention deficit hyperactivity disorder in children. **Environmental research**, v. 126, p. 105-110, 2013.

KMECICK, M. **Avaliação dos efeitos do cádmio e ácido perfluorooctanóico nos estágios iniciais de desenvolvimento de embriões de ave (*Gallus gallus*)**. Dissertação. (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

KOBUS, K. **Ação da homocisteína e do ácido fólico sobre o padrão morfológico e estrutura organizacional do telencéfalo e medula espinhal de embriões de gallus domesticus**. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

KOBUS-BIANCHINI, K.; BOURCKHARDT, G. F.; AMMAR, D.; NAZARI, E. M.; MÜLLER, Y. M. R. Homocysteine-induced changes in cell proliferation and differentiation in the chick embryo spinal cord: implications for mechanisms of neural tube defects (NTD). **Reproductive Toxicology**, v. 69, p. 167-173, 2017.

KOKRDOVA, Z. Caudal regression syndrome. **Journal of obstetrics and gynaecology: the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology**, v. 33, n. 2, p. 202-203, 2013.

KRULL, C. E. Segmental organization of neural crest migration. **Mechanisms of Development**, v. 105, p. 37 – 45, 2001.

KULESA, P.; ELLIES, D. L.; TRAINOR, P. A. Comparative analysis of neural crest cell death, migration and function during vertebrate embryogenesis. **Developmental**

**dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 229, n. 1, p. 14-29, 2004.

KULESA, P. M.; BAILEY, C. M.; KASEMEIER-KULESA, J. C.; MCLENNAN, R. Cranial neural crest migration: new rules for an old road. **Developmental biology**, v. 344, n. 2, p. 543-554, 2010.

KULESA, P. M.; FRASER, S. E. Neural crest cell dynamics revealed by time-lapse video microscopy of whole embryo chick explant cultures. **Developmental biology**, v. 204, n. 2, p. 327-344, 1998.

KULESA, P. M.; FRASER, S. E. *In ovo* time-lapse analysis of chick hindbrain neural crest cell migration shows cell interactions during migration to the branchial arches. **Development**, v. 127, n. 6, p. 1161-1172, 2000.

KUO, B. R.; ERICKSON, C.A. Regional differences in neural crest morphogenesis. **Cell adhesion and migration**, v. 4, n. 4, p. 567-585, 2010.

KURATANI, S. C.; KIRBY, M.L. Initial migration and distribution of cardiac neural crest in the avian embryo: an introduction to the concept of the circumpharyngeal crest. **American journal of anatomy**, v. 191, n. 3, p. 215-227, 1991.

KURATANI, S. C.; KIRBY, M. L. Migration and distribution of circumpharyngeal crest cells in the chick embryo. Formation of the circumpharyngeal ridge and E/C8+ crest cells in the vertebrate head region. **The Anatomical record**, v. 234, n. 2, p. 263-280, 1992.

LADHER, R. K.; WRIGHT, T. J.; MOON, A. M.; MANSOUR, S. L.; SCHOENWOLF, G. C. FGF8 initiates inner ear induction in chick and mouse. **Genes and development**, v. 19, n. 5, p. 603-613, 2005.

LARINE, L. **Toxicologia**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, 1993, p. 131-140.

LE DOUARIN, N. M. The avian embryo as a model to study the development of the neural crest: a long and still ongoing story. **Mechanisms of development**, v. 121, n. 9, p. 1089-1102, 2004.

LE DOUARIN, N. M.; CREUZET, S.; COULY, L.; DUPIN, E. Neural crest cell plasticity and its limits. **Development**, v. 131, n. 19, p. 4637-4650, 2004.

LE DOUARIN, N. M.; KALCHEIM, C. **The Neural Crest**. 2<sup>a</sup> ed. Cambridge University Press, 1999, p. 1 – 58.

LE LIEVRE, C. S.; LE DOUARIN, N. M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 34, n. 1, p. 125-154, 1975.

LI, L.; LIU, X.; PEIJNENBURG, W. J.; ZHAO, J.; CHEN, X.; YU, J.; WU, H. Pathways of cadmium fluxes in the root of the halophyte *Suaeda salsa*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 75, p. 1-7, 2012.



LI, Z. Y.; MA, Z. L.; LU, W. H.; CHENG, X.; CHEN, J. L.; SONG, X. Y.; CHUAI, M.; LEE, K. K.; YANG, X. Ethanol exposure represses osteogenesis in the developing chick embryo. **Reproductive toxicology**, v. 62, p. 53-61, 2016.

LIDSKY, T. I. ; SCHNEIDER, J. S. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. **Brain: a journal of neurology**, v. 126, n. pt1, p. 05-19, 2003.

LIFE TECHNOLOGIES. *Leadmium™ Green AM Dye* for Intracellular Detection of Lead and Cadmium. **Molecular Probes**, 2007.

LIU, J.; LIU, X.; WANG, W.; MCCAULEY, L.; PINTO-MARTIN, J.; WANG, Y.; LI, L.; YAN, C.; ROGAN, W. J. Blood lead concentrations and children's behavioral and emotional problems: a cohort study. **Journal of the American Medical Association pediatrics**, v. 168, n. 8, p. 737-745, 2014.

LIU, L.; PORTER, T.E. Endogenous thyroid hormones modulate pituitary somatotroph differentiation during chicken embryonic development. **Journal of Endocrinology**, v. 180, n. 1, p. 45-53, 2004.

LOCKITCH, G. Perspectives on Lead Toxicity. **Clinical biochemistry**, v. 26, n. 5, p. 371-381, 1993.

LOUGHENBURY, P. R.; GUMMERSON, N. W.; TSIRIKOS, A. I. Congenital spinal deformity: assessment, natural history and treatment. **Orthopaedics and Trauma**, v. 36, n. 6, p. 364-369, 2017.

LUMSDEN, A.; CLARKE, J. D.; KEYNES, R.; FRASER, S. Early phenotypic choices by neuronal precursors, revealed by clonal analysis of the chick embryo hindbrain. **Development**, v. 120, n. 6, p. 1581-1589, 1994.

LUMSDEN, A.; SPRAWSON, N.; GRAHAM, A. Segmental origin and migration of neural crest cells in the hindbrain region of the chick embryo. **Development**, v. 113, n. 4, p. 1281-1291, 1991.

LURIE, D. I.; BROOKS, D. M.; GRAY, L. C. The effect of lead on the avian auditory brainstem. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 1, p. 108-117, 2006.

MADEN, M.; GALE, E.; KOSTETSKII, I.; ZILE, M. Vitamin A quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. **Current Biology**, v. 6, n. 4, p. 417-426, 1996.

MAEDA, K.; ASAI, R.; MARUYAMA, K.; KURIHARA, Y.; NAKANISHI, T.; KURIHARA, H.; MIYAGAWA-TOMITA, S. Postotic and preotic cranial neural crest cells differently contribute to thyroid development. **Developmental biology**, v. 409, n. 1, p. 72-83, 2016.

MAMELI, O.; CARIA, M. A.; MELIS, F.; SOLINAS, A.; TAVERA, C.; IBBA, A.; TOCCO, M.; FLORE, C.; SANNA RANDACCIO, F. Neurotoxic effect of lead at low concentrations. **Brain research bulletin**, v. 55, n. 2, p. 269-275, 2001.



MARTINS-GREEN,M.; ERICKSON, C. A. Basal lamina is not a barrier to neural crest cell emigration: documentation by TEM and by immunofluorescent and immunogold labeling. **Development**, v. 101, p. 517-533, 1987.

MAS, A.; AROLA, L. L. Cadmium and lead toxicity effects on zinc, copper, nickel and iron distribution in the developing chick embryo. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 80, n. 1, p. 185– 188, 1985.

MASEDUNSKAS, A.; PORAT-SHLIOM, N.; TORA, M.; MILBERG, O.; WEIGERT, R. Intravital microscopy for imaging subcellular structures in live mice expressing fluorescent proteins. **Journal of visualized experiments: JoVE**, v.79, 2013.

MASON, L. H.; HARP, J. P.; HAN, D. Y. Pb Neurotoxicity: Neuropsychological Effects of Lead Toxicity. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

MATTSSON, A.; KÄRRMAN, A.; PINTO, R.; BRUNSTRÖM, B. Metabolic Profiling of Chicken Embryos Exposed to Perfluorooctanoic Acid (PFOA) and Agonists to Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0143780 1-20, 2015.

MCKEOWNN, S. J.; WALLACE, A. S.; ANDERSON, R. B. Expression and function of cell adhesion molecules during neural crest migration. **Developmental Biology**, v. 373, p. 244-257, 2003.

MELLOTT, D. O.; BURKE, R. D. Divergent roles for Eph and Ephrin in Avian Cranial Neural Crest. **BMC developmental biology**, v. 8: 56, 2008.

MESQUITA, M. A. **Fatores que afetam o desenvolvimento de embriões de frangos de corte durante a incubação**. Seminário (Disciplina Seminários Aplicados no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2011.

MIYAGAWA-TOMITA, S.; WALDO, K.; TOMITA, H.; KIRBY, M. L. Temporospatial study of the migration and distribution of cardiac neural crest in quail-chick chimera. **American journal of anatomy**, v. 192, n. 1, p. 79-88, 1991.

MOK, G. F.; ALREFAEI, A. F.; MCCOLL, J.; GROCOTT, T.; MÜNSTERBERG, A. Chicken as a Developmental Model. In: **Encyclopedia of Life Sciences (eLS)**. Chichester: John Wiley & Sons, 2015. 1-8.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M.G. **The Developing Human: Clinically Oriented Embryology**. 9 ed. Philadelphia, Saunders, 2013.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, n. 1, p. 167–181, 2004a.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 15, n. 2, p. 119–129, 2004b.

- MUELLER, C. A.; BURGGREN, W. W.; CROSSLEY, D. A. ANG II and baroreflex control of heart rate in embryonic chickens (*Gallus gallus domesticus*). **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 305, n. 8, p. 855–863, 2013.
- MÜLLER, Y. M. R.; KOBUS, K.; SCHATZ, J. C.; AMMAR, D.; NAZARI, E. M. Prenatal lead acetate exposure induces apoptosis and changes GFAP expression during spinal cord development. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 75, n. 1, p. 223–229, 2012.
- MÜLLER, Y. M. R.; RIVERO, L. B. D.; CARVALHO, M. C.; KOBUS, K.; FARINA, M.; NAZARI, E. M. Behavioral impairments related to lead-induced developmental neurotoxicity in chicks. **Archives of toxicology**, v. 82, n. 7, p. 445–451, 2008.
- NAGY, N.; GOLDSTEIN, A.M. Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. **Seminars in cell and developmental biology**, v. 66, p. 94–106, 2017.
- NAKAMURA, H.; AYER-LE LIEVRE, C. S. Mesectodermal capabilities of the trunk neural crest of birds. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 70, p. 01–18, 1982.
- NARBAITZ, R.; MARINO, I.; SARKAR, K. Lead-induced early lesions in the brain of the chick embryo. **Teratology**, v. 32, p. 389–396, 1985.
- NARDI, E. P.; EVANGELISTA, F. S.; TORMEN, L.; SAINT'PIERRE, T. D.; CURTIUS, A. J.; SOUZA, S. S.; BARBOSA JR, F. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. **Food Chemistry**, v. 112, p. 727–732, 2009.
- NODEN, D.M. The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. **Developmental biology**, v. 96, n. 1, p. 144–165, 1983.
- NODEN, D.M.; TRAINOR, P. A. Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. **Journal of anatomy**, v. 207, n. 5, p. 575–601, 2005.
- NOWAK-SLIWINSKA, P.; SEGURA, T.; IRUELA-ARISPE, M. L. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. **Angiogenesis**, v. 17, n. 4, p. 779–804, 2014.
- ODA, H.; TAKEICHI, M. Evolution: structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. **The Journal of cell biology**, v. 193, n. 7, p. 1137–1146, 2011.
- OLIVEIRA, R. S.; GOMES, E. S.; AFONSO, J. C. O Lixo Eletrônico: Uma abordagem para o Ensino Fundamental e Médio. **Química Nova na Escola**, V. 32, p. 240–248, 2010.
- OLSON, R. K. **Manual de Toxicologia Clínica**. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OLLSON, C. J.; SMITH, E.; HERDE, P.; JUHASZ, A.L. Influence of co-contaminant exposure on the absorption of arsenic, cadmium and lead. **Chemosphere**, v. 168, p. 658-666, 2017.

ORTOLANI-MACHADO, C. F.; RIOS, F. S.; FREITAS, P. F.; OKADA, M. A.; RODRIGUES-GALDINO, A. M.; MAIOLINO, C. V.; TAMADA, M. H. Métodos para a manipulação e o preparo de embriões e larvas. In: OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; REIS FILHO, H. S.; GROTZNER, S. R. **Técnicas e métodos para a utilização prática em microscopia**. Editora Santos, 2012. p. 237–294.

PAOLIELLO, M. M. B.; CHASIN, A. A. M. **Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos**. Cadernos de Referência Ambiental, Centro de Recursos Ambientais v. 2, 2001.

PASCALE, A.; SOSA, A.; BARES, C.; BATTOCLETI, A.; MOLL, M. J.; POSE, D.; LABORDE, A.; GONZÁLEZ, H.; FEOLA, G. E-Waste Informal Recycling: An Emerging Source of Lead Exposure in South America. **Annals of Global Health**, v. 82, n. 1, p. 197-201, 2016.

PINK, D.; LUHRS, K. A.; ZHOU, L.; SCHULTE, W.; CHASE, J.; FROSCH, C.; HABERL, U.; NGUYEN, V.; ROY, A.I.; LEWIS, J. D.; ZIJLSTRA, A.; PARSEGHIAN, M. H. High efficacy vasopermeability drug candidates identified by screening in an *ex ovo* chorioallantoic membrane model. **Scientific Reports**, v. 5, n. 15756, p. 1-11, 2015.

PROZIALECK, W. C.; GRUNWALD, G. B.; DEY, P. M.; REUHL, K. R.; PARRISH, A. R. Cadherins and NCAM as potential targets in metal toxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 182, n. 3, p. 255-265, 2002.

REDIES, C.; NEUDERT, F.; LIN, J. Cadherins in cerebellar development: translation of embryonic patterning into mature functional compartmentalization. **The cerebellum**, v.10, n.3, p. 393-408, 2011.

REHMAN, U.S. Lead-induced regional lipid peroxidation in brain. **Toxicology Letters**, v. 21, n. 3, p. 333-337, 1984.

RENNER, R. Exposure on tap: drinking water as an overlooked source of lead. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 2, p. A68-A72, 2010.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. **Mechanisms of Development**, v. 141, p. 70-77, 2016.

RICKMANN, M.; FAWCETT, J. W.; KEYNES, R. J. The migration of neural crest cells and the growth of motor axons through the rostral half of the chick somite. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 90, p. 437–455, 1985.

RIVERA-LOPEZ, C. M.; TUCKER, A. L.; LYNCH, K. R. Lysophosphatidic acid (LPA) and angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 11, n. 3, p. 301–310, 2008.



RIVERO, L. B. D.; SCHATZ, J.C.; CARVALHO, M. C.; MÜLLER, Y. M. R. Ação do acetato de chumbo sobre o padrão de desenvolvimento de embriões de *gallus domesticus*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n.1, p 83-87, 2006.

RIVERO, L. B. D **Exposição de embriões de *gallus domesticus* ao acetato de chumbo e seus efeitos sobre a histologia cerebelar e o comportamento no período pós-natal inicial**. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

ROGERS, C. D.; SAXENA, A.; BRONNER, M. E. Sip1 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during cranial neural crest EMT. **The Journal of cell biology**, v. 203, n. 5, p. 835-847, 2013.

ROVASIO, R. A.; BATTIATO, N. L. Ethanol Induces Morphological and Dynamic Changes on In Vivo and In Vitro Neural Crest Cells. **Alcoholism, clinical and experimental research**, v.26, n. 8, p. 1286-1298, 2002.

ROSENBRUCH, M. The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. **Altex**, v.14, p. 111-113, 1997.

ROY, N. M.; DEWOLF, S.; SCHUTT, A.; WRIGHT, A.; STEELE, L. Neural alterations from lead exposure in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v.46, p.40-48, 2014.

SADLER, T. W. **Langman Embriologia Médica**. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

SAKAMOTO, M; CHAM, H. M.; DOMINGO, J. L.; KUBOTA, M.; MURATA, K. Changes in body burden of mercury, lead, arsenic, cadmium and selenium in infants during early lactation in comparison with placental transfer. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 84, p. 179–84, 2012.

SANDERS, T.; LIU, Y.; BUCHNER, V.; TCHOUNWOU, P.B. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: a review. **Reviews on environmental health**, v. 24, n. 1, p. 15-45, 2009.

SARYAN, L. A.; ZENZ, C. LEAD AND ITS COMPOUNDS. In: Zenz, C. O.; Dickerson, B.; Horvath, E. P. **Occupational medicine**, 3 ed. Mosby publishing company, 1994. p. 506-540.

SCHATZ, J.C. **Caracterização morfológica de embriões de *gallus domesticus*, expostos ao acetato de chumbo, com ênfase na sua ação em nível tecidual e celular na medula**. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SCHIFFMACHER, A. T.; PADMANABHAN, R.; JHINGORY, S.; TANEYHILL, L. A. Cadherin-6B is proteolytically processed during epithelial-to-mesenchymal transitions of the cranial neural crest. **Molecular biology of the cell**, v. 25, n. 1, p. 41-54, 2014.



SCHRØDER, H. D.; FJERDINGSTAD, E.; DANSCHER, G.; FJERDINGSTAD, E. J. Heavy metals in the spinal cord of normal rats and of animals treated with chelating agents: a quantitative (zinc, copper, and lead) and histochemical study. **Histochemistry**, v. 56, n. 1, p. 1-12, 1978.

SECHRIST, J.; SCHERSON, T.; BRONNER-FRASER, M. Rhombomere rotation reveals that multiple mechanisms contribute to the segmental pattern of hindbrain neural crest migration. **Development**, v. 120, n. 7, p. 1777-1790, 1994.

SERBEDZIJA, G. N.; BURGAN, S.; FRASER, S. E.; BRONNER-FRASER, M. Vital dye labelling demonstrates a sacral neural crest contribution to the enteric nervous system of chick and mouse embryos. **Development**, v. 111, n. 4 p. 857-866, 1991.

SHAH, A.; TANEYHILL, L. A. Differential expression pattern of Annexin A6 in chick neural crest and placode cells during cranial gangliogenesis. **Gene Expression Patterns**, v. 18, p. 21-28, 2015.

SHARP, A. A.; FEDOROVICH, Y. Teratogenic effects of pyridoxine on the spinal cord and dorsal root ganglia of embryonic chickens. **Neuroscience**, v. 289, n. 4, p. 233-241, 2015.

SHEFA, S. T.; HÉROUX, P. Both physiology and epidemiology support zero tolerable blood lead levels. **Toxicology Letters**, v. 280, p. 232-237, 2017.

SINGLA, M.; SAHAI, V.; GREWAL, D.S. Neural tube defects and herbal medicines containing lead: a possible relationship. **Medical hypotheses**, v. 72, n. 3, p. 285-287, 2009.

SIMÕES-COSTA, M.; BRONNER, M. E. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. **Development**, v.142, n. 2, p. 242-257, 2015.

SLACK, J. M. W. **Essential developmental biology**. 3 ed. Wiley-Blackwell, 2012.

SLACK, J. M.; HOLLAND, P. W.; GRAHAM, C. F. The zootype and the phylotypic stage. **Nature**, v. 361, p. 490-492, 1993.

SMITH, A.; GRAHAM, A. Restricting Bmp-4 Mediated Apoptosis in Hindbrain Neural Crest. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 220, n. 3, p.276-283, 2001.

SMITH, S. M.; FLENTKE, G. R.; GARIC, A. Avian Models in Teratology and Developmental Toxicology. **Methods in Molecular Biology**, n. 889, p. 85-103, 2012.

SNIDER, N.T.; MISHINA, Y. Cranial Neural Crest Cell Contribution to craniofacial Formation, Pathology, and Future Directions in Tissue Engineering. **Birth defects research. Part C, Embryo today**, v. 102, n. 3, p. 324-332, 2014.

SOUCY, N. V.; IHNAT, M. A.; KAMAT, C. D.; HESS, L.; POST, M. J.; KLEI, L. R.; CLARK, C.; BARCOWSKY, A. Arsenic stimulate angiogenesis and tumorigenesis *in vivo*. **Toxicological sciences**, v. 76, n. 2, p. 271-279, 2003.

TAKEICHI, M. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 11-20, 2007.

TANAKA, R.; IZUMI, H.; KUROIWA A. Androgens and androgen receptor signaling contribute to ovarian development in the chicken embryo. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 433, p. 114-120, 2017.

TAYLOR, C. A.; KORDAS, K.; GOLDING, J.; EMOND, A. M. Effects of low-level prenatal lead exposure on child IQ at 4 and 8 years in a UK birth cohort study. **Neurotoxicology**, v. 62, p. 162-169, 2017.

THEVENEAU, E.; MAYOR, R. Neural crest cell migration: guidance, pathways, and cell-cell interactions. In: TRAINOR, P. A. **Neural Crest Cell: Evolution, Development and Disease**. Academic Press is an imprint of Elsevier, 2014. p. 73-88.

TOBIN, J. L.; DI FRANCO, M.; EICHERS, E.; MAY-SIMERA, H. ; GARCIA, M.; YAN, J.; QUINLAN, R.; JUSTICE, M. J.; HENNEKAM, R. C.; BRISCOE, J.; TADA, M.; MAYOR, R.; BURNS, A. J.; LUPSKI, J. R.; HAMMOND, P.; BEALES, P. L. Inhibition of neural crest migration underlies craniofacial dysmorphology and Hirschsprung's disease in Bardet-Biedl syndrome. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States America**, v. 105, n. 18, p. 6714-6719, 2008.

TONG, S.; VON SCHIRNDING, Y. E.; PRAPAMONTOL, T. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. **Bull World Health Organ**, v.78, n.9, p.1068-1077, 2000.

TRAINOR, P. A.; ARIZA-MCNAUGHTON, L.; KRUMLAUF, R. Role of the isthmus and FGFs in resolving the paradox of neural crest plasticity and pre patterning. **Science**, v.295, n. 5558, p. 1288-1291, 2002.

TRAINOR, P.; KRUMLAUF, R. Plasticity in mouse neural crest cells reveals a new patterning role for cranial mesoderm. **Nature cell biology**, v. 2, n. 2, p. 96-102, 2000.

TRINDADE, E. S.; SOARES, M. J.; GUIMARAES, F. S. F.; FRANCO, C. R. C.; BUCHI, D. F.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Marcações para microscopia. In: OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; REIS FILHO, H. S.; GROTZNER, S. R. **Técnicas e métodos para a utilização prática em microscopia**. Editora Santos, 2012. p. 189–235.

USAMI, M.; MITSUNAGA, K.; MIYAJIMA, A.; TAKAMATU, M.; KAZAMA, S.; IRIE, T.; DOI, O.; TAKIZAWA, T. Effects of 13 developmentally toxic chemicals on the migration of rat cephalic neural crest cells in vitro. **Congenital anomalies (Kyoto)**, v. 56, n. 2, p. 52-59, 2015.

VALENT, F.; LITTLE, D.; BERTOLLINI, R.; NEMER, L. E.; BARBONE, F.; TAMBURLINI, G. Burden of disease attributable to selected environmental factors and injury among children and adolescents in Europe. **Lancet**, v. 363, n. 9426, p. 2032-2039, 2004.

VALLVERDÚ-COLL, N.; LÓPEZ-ANTIA, A.; MARTINEZ-HARO, M.; ORTIZ-SANTALIESTRA, M. E.; MATEO, R. Altered immune response in mallard ducklings

exposed to lead through maternal transfer in the wild. **Environmental pollution**, v. 205, p. 350-356, 2015.

WANG, C. J.; WANG, G.; WANG, X. Y.; LIU, M.; CHUAI, M.; LEE, K. K.; HE, X. S.; LU, D. X.; YANG, X. Imidacloprid Exposure Suppresses Neural Crest Cells Generation during Early Chick Embryo Development. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 23, p. 4705-4715, 2016.

WANG, Y.; YAO, Y.; LI, Y.; NIE, H.; HE, X. Prenatal morphine exposure during late embryonic stage enhances the rewarding effects of morphine and induces the loss of membrane-bound protein kinase C- $\alpha$  in intermediate medial mesopallium in the chick. **Neuroscience Letters**, n. 639, p. 25-30, 2017.

WHO. Environmental Health Criteria 237 - Principles for evaluating health risks in children associated with exposure to chemicals. **World Health Organization**, 2006.

WHO. Lead poisoning and health. **World Health Organization**, 2016.

WOLPERT, L. **Biologia do desenvolvimento**. 1. ed. São Paulo: Artes médicas sul, 2000.

YAMAMOTO, F. Y.; FILIPAK NETO, F.; FREITAS, P. F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; ORTOLANI-MACHADO, C. F. Cadmium effects on early development of chick embryos. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 548-555, 2012.

ZHANG, B.; HUO, X.; XU, L.; CHENG, Z.; CONG, X.; LU, X.; XU, X. Elevated lead levels from e-waste exposure are linked to decreased olfactory memory in children. **Environmental pollution**, v. 231 (pt 1), p. 1112-1121, 2017.

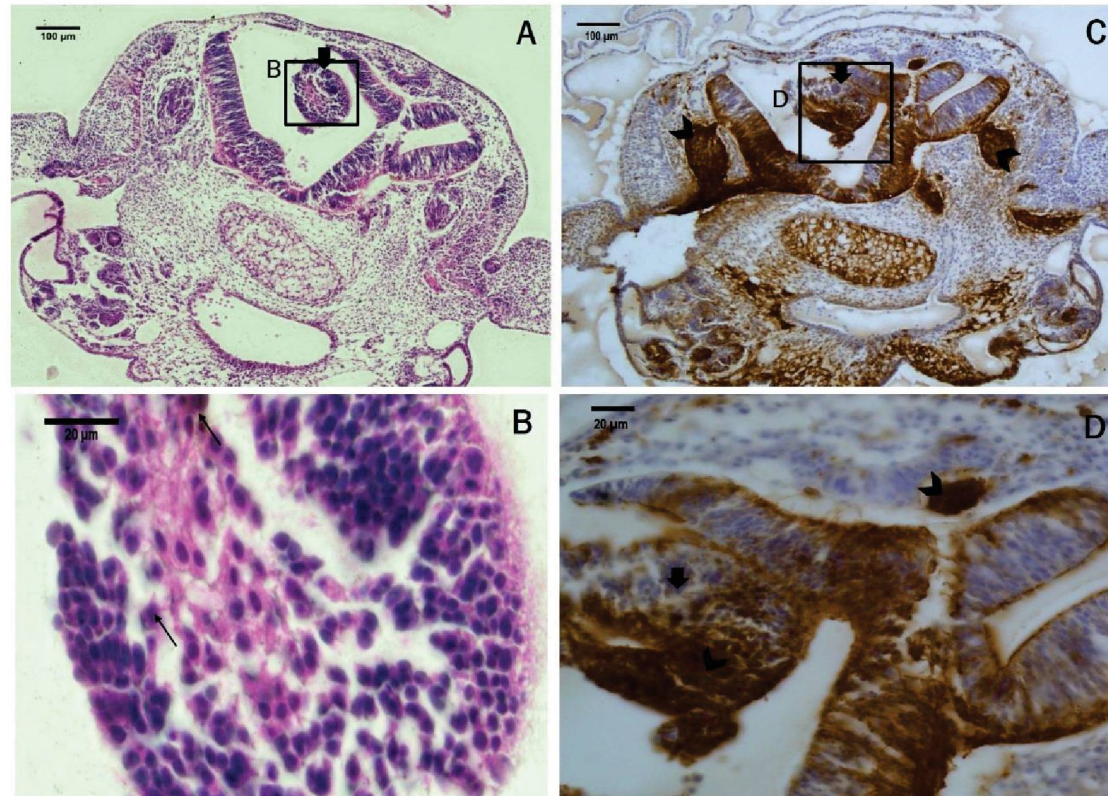
ZHANG, P.; WANG, G.; LIN, Z.; WU, Y.; ZHANG, J.; LIU, M.; LEE, K. K. H.; CHUAI, M.; YANG, X. Alcohol exposure induces chick craniofacial bone defects by negatively affecting cranial neural crest development. **Toxicology letters**, v. 281, p. 53-64, 2017.

ZHONG, Z.; ZHANG, C.; RIZAK, J. D.; CUI, Y.; XU, S.; CHE, Y. Chronic prenatal lead exposure impairs long-term memory in day old chicks. **Neuroscience letters**, v. 476, n. 1, p. 23-6, 2010.

ZIMMER, B.; LEE, G.; BALMER, N. V.; MEGANATHAN, K.; SACHINIDIS, A.; STUDER, L.; LEIST, M. Evaluation of Developmental Toxicants and Signaling Pathways in a Functional Test Based on the Migration of Human Neural Crest Cells. **Environmental health perspectives**, v. 120, n. 8, p. 1116-1122, 2012.



**APÊNDICE 1 – CORTE AO NÍVEL DE R6 EM EMBRIÃO EXPOSTO AO CHUMBO, AUTOMETALOGRAFIA E IMUNOMARCAÇÃO COM ANTI-HNK-1 POR PEROXIDASE**



A e C: imagem total do corte, onde os retângulos B em A e D em C representam as imagens em maior aumento. A: Observa-se agrupamento celular na luz do tubo neural. B: Grupamento celular em maior aumento. C: Porção adjacente ao tubo neural. C: secção correspondente a A. C-D: imuno-histoquímica para HNK-1, método de peroxidase. Seta: células apresentando depósito de chumbo. Seta larga: acúmulos celulares na luz do tubo neural. Cabeça de seta: Marcação positiva para HNK-1 (marrom). Contracoloração: HE. FONTE: A autora (2017).